Health Canada Santé Canada

GUIDANCE FOR INDUSTRY

Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin

ICH Topic Q5A

Published by authority of the
Ministry of Health

Date Adopted by the TPP	1999/12/16
Effective Date	2001/01/05

Therapeutic Products Programme
Guidance Document

Canada

Our mission is to help the people of Canada maintain and improve their health.

Health Canada

Our mission is to ensure that the drug, medical devices, and other therapeutic products available in Canada are safe, effective and of high quality and that narcotic and restricted substances are not abused or diverted from legitimate uses.

Therapeutic Products Programme

THERAPEUTIC PRODUCTS PROGRAMME WEBSITE
(TP-Web)

LET YOUR COMPUTER DO THE SEARCHING!

... Need to know how to market a new drug in Canada?

... Want information on the drug regulatory process?

... Need to know what the newest drugs on the Canadian market are?

... Want direct access to forms and policies?

... Need to know the requirements for labelling drugs?

All this and more is available on the

Therapeutic Products Programme Website
at
www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut

© Minister of Public Works and Government Services Canada 2000

Available in Canada through
Health Canada - Publications
Brooke Claxton Building, A.L. #0913A
Tunney's Pasture
Ottawa, Ontario
K1A 0K9

Tel: (613) 954-5995
Fax: (613) 941-5366

Également disponible en français sous le titre : Évaluation de la sécurité virologique des produits issus de la biotechnologie et dérivés de lignées cellulaires d'origine humaine ou animale

Catalogue No. E H42-2/67-18-2000E
ISBN 0-662-29194-8

FOREWORD

This guidance has been developed by the appropriate ICH Expert Working Group and has been subject to consultation by the regulatory parties, in accordance with the ICH Process. The ICH Steering Committee has endorsed the final draft and recommended its adoption by the regulatory bodies of the European Union, Japan and USA.

In adopting this ICH guidance, the Therapeutic Products Programme (TPP) endorses the principles and practices described therein. This document should be read in conjunction with the accompanying covering letter and with the relevant sections of other applicable Programme guidances.

Guidance documents are meant to provide assistance to industry and health care professionals on **how** to comply with the TPP policies and governing statutes and regulations. They also serve to provide review and compliance guidance to TPP staff, thereby ensuring that the Programme's mandate is implemented in a fair, consistent and effective manner.

Guidance documents are administrative instruments not having force of law and, as such, allow for flexibility in approach. Alternate approaches to the principles and practices described in this document ***may be*** acceptable provided they are supported by adequate scientific justification. Alternate approaches should be discussed in advance with the Programme to avoid the possible finding that applicable statutory or regulatory requirements have not been met.

As a corollary to the above, it is equally important to note that the Programme reserves the right to request information or material, or define conditions not specifically described in this guidance, in order to allow the Programme to adequately assess the safety, efficacy or quality of a therapeutic product. The TPP is committed to ensuring that such requests are justifiable and that decisions are clearly documented.

TABLE OF CONTENTS

I. INTRODUCTION 1

II. POTENTIAL SOURCES OF VIRUS CONTAMINATION 2
A. Viruses That Could Occur in the Master Cell Bank (MCB) 2
B. Adventitious Viruses That Could Be Introduced during Production 3

III. CELL LINE QUALIFICATION: TESTING FOR VIRUSES 3
A. Suggested Virus Tests for MCB, Working Cell Bank (WCB) and Cells at the Limit of *in vitro* Cell Age Used for Production 3
1. Master Cell Bank 3
2. Working Cell Bank 4
3. Cells at the Limit of in vitro Cell Age Used for Production 4
B. Recommended Viral Detection and Identification Assays 4
1. Tests for Retroviruses 5
2. In vitro Assays 5
3. In vivo Assays 5
4. Antibody Production Tests 5
C. Acceptability of Cell Lines 6

IV. TESTING FOR VIRUSES IN UNPROCESSED BULK 6

V. RATIONALE AND ACTION PLAN FOR VIRAL CLEARANCE STUDIES AND VIRUS TESTS ON PURIFIED BULK 7

VI. EVALUATION AND CHARACTERISATION OF VIRAL CLEARANCE PROCEDURES 9
A. The Choice of Viruses for the Evaluation and Characterisation of Viral Clearance 10
1. "Relevant" Viruses and "Model" Viruses 10
2. Other Considerations 11
B. Design and Implications of Viral Clearance Evaluation and Characterisation Studies 12
1. Facility and Staff 12
2. Scaled-Down Production System 12
3. Analysis of Step-Wise Elimination of Virus 12
4. Determining Physical Removal versus Inactivation 13
5. Inactivation Assessment 13

6. Function and Regeneration of Columns 14
7. Specific Precautions 14
C. Interpretation of Viral Clearance Studies 15
D. Limitations of Viral Clearance Studies 17
E. Statistics 18
F. Re-Evaluation of Viral Clearance 18

VII. SUMMARY 18

VIII. GLOSSARY 19

Table 1 Virus Tests to Be Performed Once at Various Cell Levels 22

Table 2 Examples of the Use and Limitations of Assays Which May Be Used to Test for Virus 23

Table 3 Virus Detected in Antibody Production Tests 24

Table 4 Action Plan for Process Assessment of Viral Clearance and Virus Tests on Purified Bulk 25

APPENDIX 1 Products Derived from Characterised Cell Banks which Were Subsequently Grown *in vivo* 26

APPENDIX 2 The Choice of Viruses for Viral Clearance Studies 27

Table A-1 Examples Of Viruses Which Have Been Used in Viral Clearance Studies 28

APPENDIX 3 Statistical Considerations for Assessing Virus Assays 29
Probability of Detection of Viruses at Low Concentrations 30

APPENDIX 4 Calculation of Reduction Factors in Studies to Determine Viral Clearance 31

APPENDIX 5 Calculation of estimated Particles per Dose 32

I. INTRODUCTION

This document is concerned with testing and evaluation of the viral safety of biotechnology products derived from characterised cell lines of human or animal origin (i.e., mammalian, avian, insect) and outlines data that should be submitted in the marketing application/registration package. For the purposes of this document the term virus excludes nonconventional transmissible agents like those associated with Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) and scrapie. Applicants are encouraged to discuss issues associated with BSE with the regulatory authorities.

The scope of the document covers products derived from cell cultures initiated from characterised cell banks. It covers products derived from *in vitro* cell culture, such as interferons, monoclonal antibodies and recombinant DNA-derived products including recombinant subunit vaccines, and also includes products derived from hybridoma cells grown *in vivo* as ascites. In this latter case, special considerations apply and additional information on testing cells propagated *in vivo* is contained in *Appendix 1*. Inactivated vaccines, all live vaccines containing self-repeating agents, and genetically engineered live vectors are excluded from the scope of this document.

The risk of viral contamination is a feature common to all biotechnology products derived from cell lines. Such contamination could have serious clinical consequences and can arise from the contamination of the source cell lines themselves (cell substrates) or from adventitious introduction of virus during production. To date, however, biotechnology products derived from cell lines have not been implicated in the transmission of viruses. Nevertheless, it is expected that the safety of these products with regard to viral contamination can be reasonably assured only by the application of a virus testing program and assessment of virus removal and inactivation achieved by the manufacturing process, as outlined below.

Three principal, complementary approaches have evolved to control the potential viral contamination of biotechnology products:

a) selecting and testing cell lines and other raw materials, including media components, for the absence of undesirable viruses which may be infectious and/or pathogenic for humans;

b) assessing the capacity of the production processes to clear infectious viruses;

c) testing the product at appropriate steps of production for absence of contaminating infectious viruses.

All testing suffers from the inherent limitation of quantitative virus assays, i.e., that the ability to detect low viral concentrations depends for statistical reasons on the size of the sample. Therefore, no single approach will necessarily establish the safety of a product. Confidence that infectious virus is absent from the final product will in many instances not be derived solely from direct testing for their presence, but also from a demonstration that the purification regimen is capable of removing and/or inactivating the viruses.

The type and extent of viral tests and viral clearance studies required at different steps of production will depend on various factors and should be considered on a case-by-case and step-by-step basis. The factors that should be taken into account include the extent of cell bank characterisation and qualification, the nature of any viruses detected, culture medium constituents, culture methods, facility and equipment design, the results of viral tests after cell culture, the ability of the process to clear viruses, and the type of product and its intended clinical use.

The purpose of this document is to provide a general framework for virus testing, experiments for the assessment of viral clearance and a recommended approach for the design of viral tests and viral clearance studies. Related information is described in the appendices and selected definitions are provided in the glossary.

The manufacturers should adjust the recommendations presented here to their specific product and its production process. The approach used by manufacturers in their overall strategy for ensuring viral safety should be explained and justified- In addition to the detailed data which is provided, an overall summary of the viral safety assessment would be useful in facilitating the review by regulatory authorities. This summary should contain a brief description of all aspects of the viral safety studies and strategies used to prevent virus contamination as they pertain to this document.

II. POTENTIAL SOURCES OF VIRUS CONTAMINATION

Viral contamination of biotechnology products may arise from the original source of the cell lines or from adventitious introduction of virus during production processes.

A. Viruses That Could Occur in the Master Cell Bank (MCB)

Cells may have latent or persistent virus infection (e.g., herpesvirus) or endogenous retrovirus which may be transmitted vertically from one cell generation to the next, since the viral genome persists within the cell. Such viruses may be constitutively expressed or may unexpectedly become expressed as an infectious virus.

Viruses can be introduced into the MCB by several routes such as: 1) derivation of cell lines from infected animals; 2) use of virus to establish the cell line; 3) use of contaminated biological reagents such as animal serum components; 4) contamination during cell handling.

B. Adventitious Viruses That Could Be Introduced during Production

Adventitious viruses can be introduced into the final product by several routes including, but not limited to, the following: 1) the use of contaminated biological reagents such as animal serum components; 2) the use of a virus for the induction of expression of specific genes encoding a desired protein; 3) the use of a contaminated reagent, such as a monoclonal antibody affinity column; 4) the use of a contaminated excipient during formulation; 5) contamination during cell and medium handling. Monitoring of cell culture parameters can be helpful in the early detection of potential adventitious viral contamination.

III. CELL LINE QUALIFICATION: TESTING FOR VIRUSES

An important part of qualifying a cell line for use in the production of a biotechnology product is the appropriate testing for the presence of virus.

A. Suggested Virus Tests for MCB, Working Cell Bank (WCB) and Cells at the Limit of *in vitro* Cell Age Used for Production

Table 1 shows an example of virus tests to be performed once only at various cell levels, including MCB, WCB and cells at the limit of *in vitro* cell age used for production.

1. Master Cell Bank

Extensive screening for both endogenous and non-endogenous viral contamination should be performed on the MCB. For heterohybrid cell lines in which one or more partners are human or non-human primate in origin, tests should be performed in order to detect viruses of human or non-human primate origin as viral contamination arising from these cells may pose a particular hazard.

Testing for non-endogenous viruses should include *in vitro* and *in vivo* inoculation tests and any other specific tests, including species-specific tests such as the mouse antibody production (MAP) test, that are appropriate, based on the passage history of the cell line, to detect possible contaminating viruses.

2. Working Cell Bank

Each WCB as a starting cell substrate for drug production should be tested for adventitious virus either by direct testing or by analysis of cells at the limit of *in vitro* cell age, initiated from the WCB. When appropriate non-endogenous virus tests have been performed on the MCB and cells cultured up to or beyond the limit of *in vitro* cell age have been derived from the WCB and used for testing for the presence of adventitious viruses, similar tests need not be performed on the initial WCB. Antibody production tests are usually not necessary for the WCB. An alternative approach in which full tests are carried out on the WCB rather than on the MCB would also be acceptable.

3. Cells at the Limit of in vitro Cell Age Used for Production

The limit of *in vitro* cell age used for production should be based on data derived from production cells expanded under pilot-plant scale or commercial-scale conditions to the proposed *in vitro* cell age or beyond. Generally, the production cells are obtained by expansion of the WCB; the MCB could also be used to prepare the production cells. Cells at the limit of *in vitro* cell age should be evaluated once for those endogenous viruses that may have been undetected in the MCB and WCB. The performance of suitable tests (e.g., *in vitro* and *in vivo)* at least once on cells at the limit of *in vitro* cell age used for production would provide further assurance that the production process is not prone to contamination by adventitious virus. If any adventitious viruses are detected at this level, the process should be carefully checked in order to determine the cause of the contamination, and completely redesigned if necessary.

B. Recommended Viral Detection and Identification Assays

Numerous assays can be used for the detection of endogenous and adventitious viruses. Table 2 outlines examples for these assays. They should be regarded as assay protocols recommended for the present, but the list is not all-inclusive or definitive. Since the most appropriate techniques may change with scientific progress, proposals for alternative techniques, when accompanied by adequate supporting data, may be acceptable. Manufacturers are encouraged to discuss these alternatives with the regulatory authorities. Other tests may be necessary depending on the individual case. Assays should include appropriate controls to ensure adequate sensitivity and specificity. Wherever a relatively high possibility of the presence of a specific virus can be predicted from the species of origin of the cell substrate, specific tests and/or approaches may be necessary. If the cell line used for production is of human or non-human primate origin, additional tests for human viruses, such as those causing immunodeficiency diseases and hepatitis, should be

performed unless otherwise justified. The polymerase chain reaction (PCR) may be appropriate for detection of sequences of these human viruses as well as for other specific viruses. The following is a brief description of a general framework and philosophical background within which the manufacturer should justify what was done.

1. ***Tests for Retroviruses***
For the MCB and for cells cultured up to or beyond the limit of *in vitro* cell age used for production, tests for retroviruses, including infectivity assays in sensitive cell cultures and electron microscopy (EM) studies, should be carried out. If infectivity is not detected and no retrovirus or retrovirus-like particles have been observed by EM, reverse transcriptase (RT) or other appropriate assays should be performed to detect retroviruses which may be noninfectious. Induction studies have not been found to be useful.

2. ***In vitro Assays***
In vitro tests are carried out by the inoculation of a test article (*see Table 2*) into various susceptible indicator cell cultures capable of detecting a wide range of human and relevant animal viruses. The choice of cells used in the test is governed by the species of origin of the cell bank to be tested, but should include a human and/or a non-human primate cell line susceptible to human viruses. The nature of the assay and the sample to be tested are governed by the type of virus which may possibly be present based on the origin or handling of the cells. Both cytopathic and hemadsorbing viruses should be sought.

3. ***In vivo Assays***
A test article (*see Table 2*) should be inoculated into animals, including suckling and adult mice, and in embryonated eggs to reveal viruses that cannot grow in cell cultures. Additional animal species may be used depending on the nature and source of the cell lines being tested. The health of the animals should be monitored and any abnormality should be investigated to establish the cause of the illness.

4. ***Antibody Production Tests***
Species-specific viruses present in rodent cell lines may be detected by inoculating test article (*see Table 2*) into virus-free animals, and examining the serum antibody level or enzyme activity after a specified period. Examples of such tests are the mouse antibody production (MAP) test, rat antibody production (RAP) test, and hamster antibody production (HAP) test. The viruses currently screened for in the antibody production assays are discussed in *Table 3*.

C. Acceptability of Cell Lines

It is recognised that some cell lines used for the manufacture of product will contain endogenous retroviruses, other viruses or viral sequences. In such circumstances, the action plan recommended for manufacture is described in Section V of this document. The acceptability of cell lines containing viruses other than endogenous retroviruses will be considered on an individual basis by the regulatory authorities, by taking into account a risk/benefit analysis based on the benefit of the product and its intended clinical use, the nature of the contaminating viruses, their potential for infecting humans or for causing disease in humans, the purification process for the product (e.g., viral clearance evaluation data), and the extent of the virus tests conducted on the purified bulk.

IV. TESTING FOR VIRUSES IN UNPROCESSED BULK

The unprocessed bulk constitutes one or multiple pooled harvests of cells and culture media. When cells are not readily accessible (e.g., hollow fiber or similar systems), the unprocessed bulk would constitute fluids harvested from the fermenter. A representative sample of the unprocessed bulk, removed from the production reactor prior to further processing, represents one of the most suitable levels at which the possibility of adventitious virus contamination can be determined with a high probability of detection. Appropriate testing for viruses should be performed at the unprocessed bulk level unless virus testing is made more sensitive by initial partial processing (e.g., unprocessed bulk may be toxic in test cell cultures whereas partially processed bulk may not be toxic).

In certain instances it may be more appropriate to test a mixture consisting of both intact and disrupted cells and their cell culture supernatants removed from the production reactor prior to further processing. Data from at least 3 lots of unprocessed bulk at pilot plant scale or commercial scale should be submitted as part of the marketing application/registration package.

It is recommended that manufacturers develop programs for the ongoing assessment of adventitious viruses in production batches. The scope, extent and frequency of virus testing on the unprocessed bulk should be determined by taking several points into consideration including the nature of the cell lines used to produce the desired products, the results and extent of virus tests performed during the qualification of the cell lines, the cultivation method, raw material sources and results of viral clearance studies. *In vitro* screening tests, using one or several cell lines, are generally employed to test unprocessed bulk. If appropriate, a PCR test or other suitable methods may be used.

Generally, harvest material in which adventitious virus has been detected should not be used to manufacture the product. If any adventitious viruses are detected at this level, the process should be carefully checked to determine the cause of the contamination, and appropriate actions taken.

V. RATIONALE AND ACTION PLAN FOR VIRAL CLEARANCE STUDIES AND VIRUS TESTS ON PURIFIED BULK

It is important to design the most relevant and rational protocol for virus tests from the MCB level, through the various steps of drug production, to the final product including evaluation and characterisation of viral clearance from unprocessed bulk. The evaluation and characterisation of viral clearance plays a critical role in this scheme. The goal should be to obtain the best reasonable assurance that the product is free of virus contamination.

In selecting viruses to use for a clearance study, it is useful to distinguish between the need to evaluate processes for their ability to clear viruses that are known to be present and the desire to estimate the robustness of the process by characterising the clearance of non-specific model viruses (described later). Definitions of relevant , specific and nonspecific model viruses are given in the glossary. Process evaluation requires knowledge of how much virus may be present in the process, such as the unprocessed bulk, and how much can be cleared in order to assess product safety. Knowledge of the time dependence for inactivation procedures is helpful in assuring the effectiveness of the inactivation process. When evaluating clearance of known contaminants, in-depth time-dependent inactivation studies, demonstration of reproducibility of inactivation/removal, and evaluation of process parameters will be needed. When a manufacturing process is characterised for robustness of clearance using non-specific model viruses, particular attention should be paid to non-enveloped viruses in the study design. The extent of viral clearance characterisation studies may be influenced by the results of tests on cell lines and unprocessed bulk. These studies should be performed as described below (*Section VI*).

Table 4 presents an example of an action plan, in terms of process evaluation and characterisation of viral clearance as well as virus tests on purified bulk, in response to the results of virus tests on cells and/or the unprocessed bulk. Various cases are considered. In all cases, characterisation of clearance using non-specific model viruses should be performed. The most common situations are **Cases A** and **B**. Production systems contaminated with a virus other than a rodent retrovirus are normally not used. Where there are convincing and well justified reasons for drug production using a cell line from **Cases C**, **D** or **E**, these should be discussed with the regulatory authorities. With **Cases C**, **D** and **E** it is important to have validated effective steps to inactivate/remove the virus in question from the manufacturing process.

Case A: Where no virus, virus-like particle or retrovirus-like particle has been demonstrated in the cells or the unprocessed bulk, virus removal and inactivation studies should be performed with non-specific model viruses as previously stated.

Case B: Where only a rodent retrovirus (or a retrovirus-like particle which is believed to be non-pathogenic, such as rodent A- and R-type particles) is present, process evaluation using a specific model virus, such as a murine leukemia virus, should be performed. Purified bulk should be tested using suitable methods having high specificity and sensitivity for the detection of the virus in question. For marketing authorisation, data from at least 3 lots of purified bulk at pilot-plant scale or commercial scale should be provided. Cell lines such as CHO, C127, BHK and murine hybridoma cell lines have frequently been used as substrates for drug production with no reported safety problems related to viral contamination of the products. For these cell lines in which the endogenous particles have been extensively characterised and clearance has been demonstrated, it is not usually necessary to assay for the presence of the non-infectious particles in purified bulk. Studies with non-specific model viruses, as in **Case A**, are appropriate.

Case C: When the cells or unprocessed bulk are known to contain a virus, other than a rodent retrovirus, for which there is no evidence of capacity for infecting humans, (such as those identified by *footnote 2* in *Table 3*, except rodent retroviruses (**Case B**)), virus removal and inactivation evaluation studies should use the identified virus. If it is not possible to use the identified virus, relevant or specific model viruses should be used to demonstrate acceptable clearance. Time-dependent inactivation for identified (or relevant or specific model) viruses at the critical inactivation step(s) should be obtained as part of process evaluation for these viruses. Purified bulk should be tested using suitable methods having high specificity and sensitivity for the detection of the virus in question. For the purpose of marketing authorisation, data from at least 3 lots of purified bulk manufactured at pilot-plant scale or commercial scale should be provided.

Case D: Where a known human pathogen, such as those indicated by *footnote 1* in *Table 3*, is identified, the product may be acceptable only under exceptional circumstances. In this instance, it is recommended that the identified virus be used for virus removal and inactivation evaluation studies and specific methods with high specificity and sensitivity for the detection of the virus in question be employed. If it is not possible to use the identified virus, relevant and/or specific model viruses (described later) should be used. The process should be shown to achieve the removal and inactivation of the selected viruses during the purification and inactivation processes. Time-dependent inactivation data for the critical inactivation step(s) should be obtained as part of process evaluation.

Purified bulk should be tested using suitable methods having high specificity and sensitivity for the detection of the virus in question. For the purpose of marketing authorisation, data from at least 3 lots of purified bulk manufactured at pilot-plant scale or commercial scale should be provided.

Case E: When a virus, which cannot be classified by currently available methodologies, is detected in the cells or unprocessed bulk, the product is usually considered unacceptable since the virus may prove to be pathogenic. In the very rare case where there are convincing and well justified reasons for drug production using such a cell line, this should be discussed with the regulatory authorities before proceeding further.

VI. EVALUATION AND CHARACTERISATION OF VIRAL CLEARANCE PROCEDURES

Evaluation and characterisation of the virus removal and/or inactivation procedures play an important role in establishing the safety of biotechnology products. Many instances of contamination in the past have occurred with agents whose presence was not known or even suspected, and though this happened to biological products derived from various source materials other than fully characterised cell lines, assessment of viral clearance will provide a measure of confidence that any unknown, unsuspected and harmful viruses may be removed. Studies should be carried out in a manner that is well documented and controlled.

The objective of viral clearance studies is to assess process step(s) that can be considered to be effective in inactivating/removing viruses and to estimate quantitatively the overall level of virus reduction obtained by the process. This should be achieved by the deliberate addition (spiking) of significant amounts of a virus to the crude material and/or to different fractions obtained during the various process steps and demonstrating its removal or inactivation during the subsequent steps. It is not necessary to evaluate or characterise every step of a manufacturing process if adequate clearance is demonstrated by the use of fewer steps. It should be borne in mind that other steps in the process may have an indirect effect on the viral inactivation/removal achieved. Manufacturers should explain and justify the approach used in studies for evaluating virus clearance.

The reduction of virus infectivity may be achieved by removal of virus particles or by inactivation of viral infectivity. For each production step assessed, the possible mechanism of loss of viral infectivity should be described with regard to whether it is due to inactivation or removal. For inactivation steps, the study should be planned in such a way that samples are taken at different times and an inactivation curve constructed (*see Section VI.B.5*).

Viral clearance evaluation studies are performed to demonstrate the clearance of a virus known to be present in the MCB and/or to provide some level of assurance that adventitious viruses which could not be detected, or might gain access to the production process, would be cleared. Reduction factors are normally expressed on a logarithmic scale which implies that, while residual virus infectivity will never be reduced to zero, it may be greatly reduced mathematically.

In addition to clearance studies for viruses known to be present, studies to characterise the ability to remove and/or inactivate other viruses should be conducted. The purpose of studies with viruses, exhibiting a range of biochemical and biophysical properties, that are not known or expected to be present, is to characterise the robustness of the procedure rather than to achieve a specific inactivation or removal goal. A demonstration of the capacity of the production process to inactivate or remove viruses is desirable (*see Section VI.C*). Such studies are not performed to evaluate a specific safety risk. Therefore, a specific clearance value needs not be achieved.

A. The Choice of Viruses for the Evaluation and Characterisation of Viral Clearance

Viruses for clearance evaluation and process characterisation studies should be chosen to resemble viruses which may contaminate the product and to represent a wide range of physico-chemical properties in order to test the ability of the system to eliminate viruses in general. The manufacturer should justify the choice of viruses in accordance with the aims of the evaluation and characterisation study and the guidance provided in this guideline.

1. "Relevant" Viruses and "Model" Viruses

A major issue in performing a viral clearance study is to determine which viruses should be used. Such viruses fall into three categories: relevant viruses, specific model viruses and non-specific model viruses.

Relevant viruses are viruses used in process evaluation of viral clearance studies which are either the identified viruses, or of the same species as the viruses that are known, or likely to contaminate the cell substrate or any other reagents or materials used in the production process. The purification and/or inactivation process should demonstrate the capability to remove and/or inactivate such viruses. When a relevant virus is not available or when it is not well adapted to process evaluation of viral clearance studies (e.g., it cannot be grown *in vitro* to sufficiently high titers), a specific model virus should be used as a substitute. An appropriate specific model virus may be a virus which is closely related to the known or suspected virus (same genus or family), having similar physical and chemical properties to the observed or suspected virus.

Cell lines derived from rodents usually contain endogenous retrovirus particles or retrovirus-like particles, which may be infectious (C-type particles) or non-infectious (cytoplasmic A- and R-type particles). The capacity of the manufacturing process to remove and/or inactivate rodent retroviruses from products obtained from such cells should be determined. This may be accomplished by using a murine leukemia virus, a specific model virus in the case of cells of murine origin. When human cell lines secreting monoclonal antibodies have been obtained by the immortalization of B lymphocytes by Epstein-Barr Virus (EBV) the ability of the manufacturing process to remove and/or inactivate a herpes virus should be determined. Pseudorabies virus may also be used as a specific model virus.

When the purpose is to characterise the capacity of the manufacturing process to remove and/or inactivate viruses in general, ie., to characterise the robustness of the clearance process, viral clearance characterisation studies should be performed with non-specific model virus with differing properties. Data obtained from studies with relevant and/or specific model virus may also contribute to this assessment. It is not necessary to test all types of viruses. Preference should be given to viruses that display a significant resistance to physical and/or chemical treatments. The results obtained for such viruses provide useful information about the ability of the production process to remove and/or inactivate viruses in general. The choice and number of viruses used will be influenced by the quality and characterisation of the cell lines and the production process.

Examples of useful model viruses representing a range of physico-chemical structures and examples of viruses which have been used in viral clearance studies are given in *Appendix 2* and *Table A-1*.

2. *Other Considerations*

Additional points to be considered are as follows:

a) Viruses which can be grown to high titer are desirable, although this may not always be possible.

b) There should be an efficient and reliable assay for the detection of each virus used, for every stage of manufacturing that is tested.

c) Consideration should be given to the health hazard which certain viruses may pose to the personnel performing the clearance studies.

B. Design and Implications of Viral Clearance Evaluation and Characterisation Studies

1. Facility and Staff

It is inappropriate to introduce any virus into a production facility because of GMP constraints. Therefore, viral clearance studies should be conducted in a separate laboratory equipped for virological work and performed by staff with virological expertise in conjunction with production personnel involved in designing and preparing a scaled-down version of the purification process.

2. Scaled-Down Production System

The validity of the scaling down should be demonstrated. The level of purification of the scaled-down version should represent as closely as possible the production procedure. For chromatographic equipment, column bed-height, linear flow-rate, flow-rate-to-bed-volume ratio (i.e., contact time), buffer and gel types, pH, temperature, and concentration of protein, salt, and product should all be shown to be representative of commercial-scale manufacturing. A similar elution profile should result. For other procedures, similar considerations apply. Deviations which cannot be avoided should be discussed with regard to their influence on the results.

3. Analysis of Step-Wise Elimination of Virus

When viral clearance studies are being performed, it is desirable to assess the contribution of more than one production step to virus elimination. Steps which are likely to clear virus should be individually assessed for their ability to remove and inactivate virus and careful consideration should be given to the exact definition of an individual step. Sufficient virus should be present in the material of each step to be tested so that an adequate assessment of the effectiveness of each step is obtained. Generally, virus should be added to in-process material of each step to be tested. In some cases, simply adding high titer virus to unpurified bulk and testing its concentration between steps will be sufficient. Where virus removal results from separation procedures, it is recommended that, if appropriate and if possible, the distribution of the virus load in the different fractions be investigated. When virucidal buffers are used in multiple steps within the manufacturing process, alternative strategies such as parallel spiking in less virucidal buffers, may be carried out as part of the overall process assessment.

The virus titer before and after each step being tested should be determined. Quantitative infectivity assays should have adequate sensitivity and reproducibility and should be performed with sufficient replicates to ensure adequate statistical validity of the result. Quantitative assays not associated with infectivity may be used if justified. Appropriate virus controls should be included in all infectivity assays to ensure the sensitivity of the method. Also, the statistics of sampling virus when at low concentrations should be considered (*Appendix 3*).

4. ***Determining Physical Removal versus Inactivation***

Reduction in virus infectivity may be achieved by the removal or inactivation of virus. For each production step assessed, the possible mechanism of loss of viral infectivity should be described with regard to whether it is due to inactivation or removal. If little clearance of infectivity is achieved by the production process, and the clearance of virus is considered to be a major factor in the safety of the product, specific or additional inactivation/removal steps should be introduced. It may be necessary to distinguish between removal and inactivation for a particular step, for example when there is a possibility that a buffer used in more than one clearance step may contribute to inactivation during each step; i.e., the contribution to inactivation by a buffer shared by several chromatographic steps and the removal achieved by each of these chromatographic steps should be distinguished.

5. ***Inactivation Assessment***

For assessment of viral inactivation, unprocessed crude material or intermediate material should be spiked with infectious virus and the reduction factor calculated. It should be recognised that virus inactivation is not a simple, first order reaction and is usually more complex, with a fast phase 1 and a slow phase 2. The study should, therefore, be planned in such a way that samples are taken at different times and an inactivation curve constructed. It is recommended that studies for inactivation include at least one time point less than the minimum exposure time and greater than zero, in addition to the minimum exposure time. Additional data are particularly important where the virus is a relevant virus known to be a human pathogen and an effective inactivation process is being designed. However, for inactivation studies in which non-specific model viruses are used or when specific model viruses are used as surrogates for virus particles such as the CHO intracytoplasmic retrovirus-like particles, reproducible clearance should be demonstrated in at least two independent studies. Whenever possible, the initial virus load should be determined from the virus which can be detected in the spiked starting material. If this is not possible, the initial virus load may be

calculated from the titer of the spiking virus preparation. Where inactivation is too rapid to plot an inactivation curve using process conditions, appropriate controls should be performed to demonstrate that infectivity is indeed lost by inactivation.

6. ***Function and Regeneration of Columns***

Over time and after repeated use, the ability of chromatography columns and other devices used in the purification scheme to clear virus may vary. Some estimate of the stability of the viral clearance after several uses may provide support, for repeated use of such columns. Assurance should be provided that any virus potentially retained by the production system would be adequately destroyed or removed prior to reuse of the system. For example, such evidence may be provided by demonstrating that the cleaning and regeneration procedures do inactivate or remove virus.

7. ***Specific Precautions***

a) Care should be taken in preparing the high-titer virus to avoid aggregation which may enhance physical removal and decrease inactivation thus distorting the correlation with actual production.

b) Consideration should be given to the minimum quantity of virus which can be reliably assayed.

c) The study should include parallel control assays to assess the loss of infectivity of the virus due to such reasons as the dilution, concentration, filtration or storage of samples before titration.

d) The virus spike should be added to the product in a small volume so as not to dilute or change the characteristics of the product. Diluted, test-protein sample is no longer identical to the product obtained at commercial scale.

e) Small differences in, for example, buffers, media, or reagents, can substantially affect viral clearance.

f) Virus inactivation is time-dependent, therefore, the amount of time a spiked product remains in a particular buffer solution or on a particular chromatography column should reflect the conditions of the commercial-scale process.

g) Buffers and product should be evaluated independently for toxicity or interference in assays used to determine the virus titer, as these components may adversely affect the indicator cells. If the solutions are toxic to the indicator cells, dilution, adjustment of the pH, or dialysis of the buffer containing spiked virus might be necessary. If the product itself has anti-viral activity, the clearance study may need to be performed without the product in a mock run, although omitting the product or substituting a similar protein that does not have anti-viral activity could affect the behaviour of the virus in some production steps. Sufficient controls to demonstrate the effect of procedures used solely to prepare the sample for assay (e.g., dialysis, storage) on the removal/inactivation of the spiking virus should be included.

h) Many purification schemes use the same or similar buffers or columns repetitively. The effects of this approach should be taken into account when analysing the data. The effectiveness of virus elimination by a particular process may vary with the stage in manufacture at which it is used.

i) Overall reduction factors may be underestimated where production conditions or buffers are too cytotoxic or virucidal and should be discussed on a case-by-case basis. Overall reduction factors may also be overestimated due to inherent limitations or inadequate design of viral clearance studies.

C. Interpretation of Viral Clearance Studies

Acceptability

The object of assessing virus inactivation/removal is to evaluate and characterise process steps that can be considered to be effective in inactivating/removing viruses and to estimate quantitatively the overall level of virus reduction obtained by the manufacturing process. For virus contaminants, as in **Cases B-E**, it is important to show that not only is the virus eliminated or inactivated, but that there is excess capacity for viral clearance built into the purification process to assure an appropriate level of safety for the final product. The amount of virus eliminated or inactivated by the production process should be compared to the amount of virus which may be present in unprocessed bulk.

To carry out this comparison, it is important to estimate the amount of virus in the unprocessed bulk. This estimate should be obtained using assays for infectivity or other methods such as transmission electron microscopy (TEM). The entire purification process should be able to eliminate substantially more virus than is estimated to be present in a single-dose-equivalent of unprocessed bulk. See *Appendix 4* for calculation of virus reduction factors and *Appendix 5* for calculation of estimated particles per dose.

Manufacturers should recognise that clearance mechanisms may differ between virus classes. A combination of factors must be considered when judging the data supporting the effectiveness of virus inactivation/removal procedures. These include:

(i) The appropriateness of the test virus used

(ii) The design of the clearance studies

(iii) The log reduction achieved

(iv) The time-dependence of inactivation

(v) The potential effects of variation in process parameters on virus inactivation/removal

(vi) The limits of assay sensitivities

(vii) The possible selectivity of inactivation/removal procedure(s) for certain classes of viruses.

Effective clearance may be achieved by any of the following: multiple inactivation steps, multiple complementary separation steps, or combinations of inactivation and separation steps. Since separation methods may be dependent on the extremely specific physico-chemical properties of a virus which influence its interaction with gel matrices and precipitation properties, model viruses may be separated in a different manner than a target virus. Manufacturing parameters influencing separation should be properly defined and controlled. Differences may originate from changes in surface properties such as glycosylation. However, despite these potential variables, effective removal can be obtained by a combination of complementary separation steps or combinations of

inactivation and separation steps. Therefore, well designed separation steps, such as chromatographic procedures, filtration steps and extractions, can be effective virus removal steps provided that they are performed under appropriately controlled conditions. An effective virus removal step should give reproducible reduction of virus load shown by at least two independent studies.

An overall reduction factor is generally expressed as the sum of the individual factors. However, reduction in virus titer of the order of 1 $\log_{10}$ or less would be considered negligible and would be ignored unless justified.

If little reduction of infectivity is achieved by the production process, and the removal of virus is considered to be a major factor in the safety of the product, a specific additional inactivation/removal step or steps should be introduced. For all viruses, manufacturers should justify the acceptability of the reduction factors obtained. Results will be evaluated on the basis of the factors listed above.

D. Limitations of Viral Clearance Studies

Viral clearance studies are useful for contributing to the assurance that an acceptable level of safety in the final product is achieved but do not by themselves establish safety. However, a number of factors in the design and execution of viral clearance studies may lead to an incorrect estimate of the ability of the process to remove virus infectivity. These factors include the following:

1. Virus preparations used in clearance studies for a production process are likely to be produced in tissue culture. The behaviour of a tissue culture virus in a production step may be different from that of the native virus; for example, if native and cultured viruses differ in purity or degree of aggregation.

2. Inactivation of virus infectivity frequently follows a biphasic curve in which a rapid initial phase is followed by a slower phase. It is possible that virus escaping a first inactivation step may be more resistant to subsequent steps. For example, if the resistant fraction takes the form of virus aggregates, infectivity may be resistant to a range of different chemical treatments and to heating.

3. The ability of the overall process to remove infectivity is expressed as the sum of the logarithm of the reductions at each step. The summation of the reduction factors of multiple steps, particularly of steps with little reduction (e.g., below 1

log_{10}), may overestimate the true potential for virus elimination. Furthermore, reduction values achieved by repetition of identical or near identical procedures should not be included unless justified.

4. The expression of reduction factors as logarithmic reductions in titer implies that, while residual virus infectivity may be greatly reduced, it will never be reduced to zero. For example, a reduction in the infectivity of a preparation containing 8 log_{10} infectious units per ml by a factor of 8 log_{10}. leaves zero log, per ml or one infectious unit per ml, taking into consideration the limit of detection of the assay.

5. Pilot-plant scale processing may differ from commercial-scale processing despite care taken to design the scaled-down process.

6. Addition of individual virus reduction factors resulting from similar inactivation mechanisms along the manufacturing process may overestimate overall viral clearance.

E. Statistics

The viral clearance studies should include the use of statistical analysis of the data to evaluate the results. The study results should be statistically valid to support the conclusions reached (refer to *Appendix 3*).

F. Re-Evaluation of Viral Clearance

Whenever significant changes in the production or purification process are made, the effect of that change, both direct and indirect, on viral clearance should be considered and the system re-evaluated as needed. For example, changes in production processes may cause significant changes in the amount of virus produced by the cell line; changes in process steps may change the extent of viral clearance.

VII. SUMMARY

This document suggests approaches for the evaluation of the risk of viral contamination and for the removal of virus from product, thus contributing to the production of safe biotechnology products derived from animal or human cell lines and emphasises the value of many strategies, including:

A. Thorough characterisation/screening of cell substrate starting material in order to identify which, if any, viral contaminants are present;

B. Assessment of risk by determination of the human tropism of the contaminants;

C. Establishment of an appropriate program of testing for adventitious viruses in unprocessed bulk;

D. Careful design of viral clearance studies using different methods of virus inactivation or removal in the same production process in order to achieve maximum viral clearance; and

E. Performance of studies which assess virus inactivation and removal.

VIII. GLOSSARY

Adventitious Virus
See Virus.

Cell Substrate
Cells used to manufacture product.

Endogenous Virus
See Virus.

Inactivation
Reduction of virus infectivity caused by chemical or physical modification.

***In Vitro* Cell Age**
A measure of the period between thawing of the MCB vial(s) and harvest of the production vessel measured by elapsed chronological time in culture, population doubling level of the cells or passage level of the cells when subcultivated by a defined procedure for dilution of the culture.

Master Cell Bank (MCB)
An aliquot of a single pool of cells which generally has been prepared from the selected cell clone under defined conditions, dispensed into multiple containers and stored under defined conditions. The MCB is used to derive all working cell banks. The testing performed on a new MCB (from a previous initial cell clone, MCB or WCB) should be the same as for the MCB, unless justified.

Minimum Exposure Time
The shortest period for which a treatment step will be maintained.

Non-endogenous Virus
See Virus.

Process Characterisation of Viral Clearance
Viral clearance studies in which non-specific model viruses are used to assess the robustness of the manufacturing process to remove and/or inactivate viruses.

Process Evaluation Studies of Viral Clearance
Viral clearance studies in which relevant and/or specific model viruses are used to determine the ability of the manufacturing process to remove and/or inactivate these viruses.

Production Cells
Cell substrate used to manufacture product.

Unprocessed Bulk
One or multiple pooled harvests of cells and culture media. When cells are not readily accessible, the unprocessed bulk would constitute fluid harvested from the fermenter.

Virus
Intracellularly replicating infectious agents that are potentially pathogenic, possessing only a single type of nucleic acid (either RNA or DNA), are unable to grow and undergo binary fission, and multiply in the form of their genetic material.

> **Adventitious Virus**
> Unintentionally introduced contaminant viruses.
>
> **Endogenous Virus**
> Viral entity whose genome is part of the germ line of the species of origin of the cell line and is covalently integrated into the genome of animal from which the parental cell line was derived. For the purposes of this document, intentionally introduced, non-integrated viruses such as EBV used to immortalise cell substrates or Bovine Papilloma Virus fit in this category.
>
> **Non-endogenous Virus**
> Viruses from external sources present in the Master Cell Bank.

Non-specific Model Virus
A virus used for characterisation of viral clearance of the process when the purpose is to characterise the capacity of the manufacturing process to remove and/or inactivate viruses in general, i.e., to characterise the robustness of the purification process.

Relevant Virus
Virus used in process evaluation studies which is either the identified virus, or of the same species as the virus that is known, or likely to contaminate the cell substrate or any other reagents or materials used in the production process.

Specific Model Virus
Virus which is closely related to the known or suspected virus (same genus or family), having similar physical and chemical properties to those of the observed or suspected virus.

Viral Clearance
Elimination of target virus by removal of viral particles or inactivation of viral infectivity.

Virus-like Particles
Structures visible by electron microscopy which morphologically appear to be related to known viruses.

Virus Removal
Physical separation of virus particles from the intended product.

Working Cell Bank (WCB)
The WCB is prepared from aliquots of a homogeneous suspension of cells obtained from culturing the MCB under defined culture conditions.

Table 1 Virus Tests to Be Performed Once at Various Cell Levels

	MCB	*WCB*[a]	*Cells at the limit*[b]
Tests for Retroviruses and Other Endogenous Viruses			
Infectivity	+	-	+
Electron microscopy[c]	+[c]	-	+[c]
Reverse transcriptase[d]	+[d]	-	+[d]
Other virus-specific tests[e]	as appropriate[e]	-	as appropriate[e]
Tests for Non-endogenous or Adventitious Viruses			
In vitro Assays	+	-[f]	+
In vivo Assays	+	-[f]	+
Antibody production tests[g]	+[g]	-	-
Other virus-specific tests[h]	+[h]	-	-

a. See text - Section III.A.2.

b. Cells at the limit: cells at the limit of *in vitro* cell age used for production (See text - Section III.A.3).

c. May also detect other agents.

d. Not necessary if positive by retrovirus infectivity test.

e. As appropriate for cell lines which are known to have been infected by such agents.

f. For the first WCB, this test should be performed on cells at the limit of *in vitro* cell age, generated from that WCB; for WCBs subsequent to the first WCB, a single *in vitro* and *in vivo* test can be done either directly on the WCB or on cells at the limit of *in vitro* cell age.

g. e.g., MAP, RAP, HAP, - Usually applicable for rodent cell lines.

h. e.g., tests for cell lines derived from human, non-human primate or other cell lines as appropriate.

Table 2 Examples of the Use and Limitations of Assays Which May Be Used to Test for Virus

TEST	*TEST ARTICLE*	*DETECTION CAPABILITY*	*DETECTION LIMITATION*
Antibody production	Lysate of cells and their culture medium	Specific viral antigens	Antigens not infectious for animal test system
in vivo virus screen	Lysate of cells and their culture medium	Broad range of viruses pathogenic for humans	Agents failing to replicate or produce diseases in the test system
in vitro virus screen for:		Broad range of viruses pathogenic for humans	Agents failing to replicate or produce diseases in the test system
1. Cell bank characterisation	1. Lysate of cells and their culture medium (for cultivation, intact cells should be in the test article)		
2. Production screen	2. Unprocessed bulk harvest or lysate of cells and their cell culture medium from the production reactor		
TEM on:		Virus and virus-like particles	Qualitative assay with assessment of identity
1. Cell substrate 2. Cell culture supernatant	1. Viable cells 2. Cell-free culture supernatant		
Reverse transcriptase (RT)	Cell-free culture supernatant	Retroviruses and expressed retroviral RT	Only detects enzymes with optimal activity under preferred conditions. Interpretations may be difficult due to presence of cellular enzymes; background with some concentrated samples
Retrovirus (RV) infectivity	Cell-free culture supernatant	Infectious retroviruses	RV failing to replicate or form discrete foci or plaques in the chosen test system
Cocultivation	Viable cells	Infectious retroviruses	RV failing to replicate
1. Infectivity endpoint			1. See above under RV infectivity
2. TEM endpoint			2. See above under TEM[a]
3. RT endpoint			3. See above under RT
PCR (Polymerase chain reaction)	Cells, culture fluid and other materials	Specific virus sequences	Primer sequences must be present. Does not indicate whether virus is infectious

a In addition, difficult to distinguish test article from indicator cells

Table 3 Virus Detected in Antibody Production Tests

MAP	*HAP*	*RAP*
Ectromelia Virus[2,3]	Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCM)[1,3]	Hantaan Virus[1,3]
Hantaan Virus[1,3]	Pneumonia Virus of Mice (PVM)[2,3]	Kilham Rat Virus (KRV)[2,3]
K Virus[2]	Reovirus Type 3 (Reo3)[1,3]	Mouse Encephalomyelitis Virus (Theilers, GDVII)[2]
Lactic Dehydrogenase Virus (LDM)[1,3]	Sendai Virus[1,3]	Pneumonia Virus of Mice (PVM)[2,3]
Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCM)[1,3]	SV5	Rat Coronavirus (RCV)[2]
Minute Virus of Mice[2,3]		Reovirus Type 3 (Reo3)[1,3]
Mouse Adenovirus (MAV)[2,3]		Sendai Virus[1,3]
Mouse Cytomegalovirus (MCMV)[2,3]		Sialoacryoadenitis Virus (SDAV)[2]
Mouse Encephalomyelitis Virus (Theilers, GDVII)[2]		Toolan Virus (HI)[2,3]
Mouse Hepatitus Virus (MHV)[2]		
Mouse Rotavirus (EDIM)[2,3]		
Pneumonia Virus of Mice (PVM)[2,3]		
Polyoma Virus [2]		
Reovirus Type 3 (Reo3)[1,3]		
Sendai Virus[1,3]		
Thymic Virus[2]		

1. Viruses for which there is evidence of capacity for infecting humans or primates.

2. Viruses for which there is no evidence of capacity for infecting humans.

3. Virus capable of replicating *in vitro* in cells of human or primate origin.

Table 4 Action Plan for Process Assessment of Viral Clearance and Virus Tests on Purified Bulk

	Case A	*Case B*	*Case C*[2]	*Case D*[2]	*Case E*[2]
STATUS					
Presence of virus[1]	-	-	+	+	(+)[3]
Virus-like particles[1]	-	-	-	-	(+)[3]
Retrovirus-like particles[1]	-	+	-	-	(+)[3]
Virus identified	not applicable	+	+	+	-
Virus pathogenic for humans	not applicable	-4	-4	+	unknown
ACTION					
Process characterisation of viral clearance using non-specific model viruses	yes[5]	yes[5]	yes[5]	yes[5]	yes[7]
Process evaluation of viral clearance using relevant or specific model viruses	no	yes[6]	yes[6]	yes[6]	yes[7]
Test for virus in purified bulk	not applicable	yes[8]	yes[8]	yes[8]	yes[8]

1. Results of virus tests for the cell substrate and/or at the unprocessed bulk level. Cell cultures used for production which are contaminated with viruses will generally not be acceptable. Endogenous viruses (such as retroviruses) or viruses that are an integral part of the MCB may be acceptable if appropriate viral clearance evaluation procedures are followed.

2. The use of source material which is contaminated with viruses, whether or not they are known to be infectious and/or pathogenic in humans, will only be permitted under very exceptional circumstances.

3. Virus has been observed by either direct or indirect methods.

4. Believed to be non-pathogenic.

5. Characterisation of clearance using non-specific model viruses should be performed.

6. Process evaluation for relevant viruses or specific model viruses should be performed.

7. See text under Case E.

8. The absence of detectable virus should be confirmed for purified bulk by means of suitable methods having high specificity and sensitivity for the detection of the virus in question. For the purpose of marketing authorization, data from at least 3 lots of purified bulk manufactured at pilot-plant scale or commercial scale should be provided. However, for cell lines such as CHO cells for which the endogenous particles have been extensively characterised and adequate clearance has been demonstrated, it is not usually necessary to assay for the presence of the non-infectious particles in purified bulk.

APPENDIX 1 Products Derived from Characterised Cell Banks which Were Subsequently Grown *in vivo*

For products manufactured from fluids harvested from animals inoculated with cells from characterised banks, additional information regarding the animals should be provided.

Whenever possible, animals used in the manufacture of biotechnological/biologicalproducts should be obtained from well defined, specific pathogen-free colonies. Adequate testing for appropriate viruses, such as those listed in *Table 3*, should be performed. Quarantine procedures for newly arrived as well as diseased animals should be described, and assurance provided that all containment, cleaning and decontamination methodologies employed within the facility are adequate to contain the spread of adventitious agents. This may be accomplished through the use of a sentinel program. A listing of agents for which testing is performed should also be included. Veterinary support services should be available on-site or within easy access. The degree to which the vivarium is segregated from other areas of the manufacturing facility should be described. Personnel practices should be adequate to ensure safety.

Procedures for the maintenance of the animals should be fully described. These would include diet, cleaning and feeding schedules, provisions for periodic veterinary care if applicable, and details of special handling that the animals may require once inoculated. A description of the priming regimen(s) for the animals, the preparation of the inoculum and the site and route of inoculation should also be included.

The primary harvest material from animals may be considered an equivalent stage of manufacture to unprocessed bulk harvest from a bioreactor. Therefore, all testing considerations previously outlined in Section IV of this document should apply. In addition, the manufacturer should assess the bioburden of the unprocessed bulk, determine whether the material is free of mycoplasma, and perform species-specific assay(s) as well as *in vivo* testing in adult and suckling mice.

APPENDIX 2 The Choice of Viruses for Viral Clearance Studies

A. Examples of useful "model" viruses

1. Non-specific model viruses representing a range of physico-chemical structures:

   - SV40 (Polyomavirus maccacae 1), human polio virus 1 (Sabin), animal parvovirus or some other small, non-enveloped viruses;
   - a parainfluenza virus or influenza virus, Sindbis virus or some other medium-to-large enveloped, RNA viruses;
   - a herpes virus (e.g., HSV-l or a pseudorabies virus), or some other medium-to-large, DNA viruses.

   These viruses are examples only and their use is not mandatory.

2. For rodent cell substrates, murine retroviruses are commonly used as specific model viruses.

B. Examples of viruses which have been used in viral clearance studies

Several viruses which have been used in viral clearance studies are listed in *Table A-1*. However, since these are merely examples, the use of any of the viruses in the table is not mandatory and manufacturers are invited to consider other viruses, especially those which may be more appropriate for their individual production processes. Generally, the process should be assessed for its ability to clear at least three different viruses with differing characteristics.

Table A-1 Examples Of Viruses Which Have Been Used in Viral Clearance Studies

Virus	*Family*	*Genus*	*Natural host*	*Genome*	*Env*	*Size (nm)*	*Shape*	*Resistance**
Vesicular Stomatitis Virus	Rhabdo	Vesiculovirus	Equine Bovine	RNA	yes	70x150	Bullet	Low
Parainfluenza Virus	Paramyxo	Paramyxovirus	Various	RNA	yes	100-200+	Pleo/Spher	Low
MuLV	Retro	Type C oncovirus	Mouse	RNA	yes	80-110	Spherical	Low
Sindbis Virus	Toga	Alphavirus	Human	RNA	yes	60-70	Spherical	Low
BVDV	Flavi	Pestivirus	Bovine	RNA	yes	50-70	Pleo/Spher	Low
Pseudorabies Virus	Herpes		Swine	DNA	yes	120-200	Spherical	Med
Poliovirus Sabin Type 1	Picorna	Enterovirus	Human	RNA	no	25-30	Icosahedral	Med
Encephalo-myocarditis Virus (EMC)	Picorna	Cardiovirus	Mouse	RNA	no	25-30	Icosahedral	Med
Reovirus	Reo	Orthoreovirus	Various	RNA	no	60-80	Spherical	Med
SV40	Papova	Polymavirus	Monkey	DNA	no	40-50	Icosahedral	Very high
Parvoviruses (canine, porcine)	Parvo	Parvovirus	Canine Porcine	DNA	no	18-24	Icosahedral	Very high

*Resistance to physico-chemical treatments based on studies of production processes. Resistance is relative to the specific treatment and it is used in the context of the understanding of the biology of the virus and the nature of the manufacturing process. Actual results will vary according to the treatment.

These viruses are examples only and their use is not mandatory.

APPENDIX 3 Statistical Considerations for Assessing Virus Assays

Virus titrations suffer the problems of variation common to all biological assay systems. Assessment of the accuracy of the virus titrations and reduction factors derived from them and the validity of the assays should be performed to define the reliability of a study. The objective of statistical evaluation is to establish that the study has been carried out to an acceptable level of virological competence.

1. Assay methods may be either quantal or quantitative. Quantal methods include infectivity assays in animals or in tissue-culture-infectious-dose(TCID) assays, in which the animal or cell culture is scored as either infected or not. Infectivity titers are then measured by the proportion of animals or culture infected. In quantitative methods, the infectivity measured varies continuously with the virus input. Quantitative methods include plaque assays where each plaque counted corresponds to a single infectious unit. Both quantal and quantitative assays are amenable to statistical evaluation.

2. Variation can arise with an assay as a result of dilution errors, statistical effects and differences within the assay system which are either unknown or difficult to control. These effects are likely to be greater when different assay runs are compared (between-assay variation) than when results within a single assay run are compared (within-assay variation).

3. The 95% confidence limits for results of within-assay variation normally should be on the order of ± 0.5 $\log_{10}$ of the mean. Within-assay variation can be assessed by standard textbook methods. Between-assay variation can be monitored by the inclusion of a reference preparation, the estimate of whose potency should be within approximately 0.5 $\log_{10}$ of the mean estimate established in the laboratory for the assay to be acceptable. Assays with lower precision may be acceptable with appropriate justification.

4. The 95% confidence limits for the reduction factor observed should be calculated wherever possible in studies of clearance of relevant and specific model viruses. If the 95% confidence limits for the viral assays of the starting material are +s, and for the viral assays of the material after the step are +a, the 95% confidence limits for the reduction factor are
$\pm\sqrt{s^2+a^2}$.

Probability of Detection of Viruses at Low Concentrations

At low virus concentrations (e.g., in the range of 10 to 1,000 infectious particles per liter) it is evident that a sample of a few milliliters may or may not contain infectious particles. The probability, p, that this sample does not contain infectious viruses is:

$$P = ((V-v)/V)^n$$

where V (liter) is the overall volume of the material to be tested, v (liter) is the volume of the sample and n is the absolute number of infectious particles statistically distributed in V.

If V>>v, this equation can be approximated by the Poisson distribution:

$$p = e^{-cv}$$

where c is the concentration of infectious particles per liter.

or, $c = \ln p / -v$

As an example, if a sample volume of 1 ml is tested, the probabilities p at virus concentrations ranging from 10 to 1,000 infectious particles per liter are:

c	10	100	1000
p	0.99	0.90	0.37

This indicates that for a concentration of 1,000 viruses per liter, in 37% of sampling, 1 ml will not contain a virus particle.

If only a portion of a sample is tested for virus and the test is negative, the amount of virus which would have to be present in the total sample in order to achieve a positive result should be calculated and this value taken into account when calculating a reduction factor. Confidence limits at 95% are desirable. However, in some instances, this may not be practical due to material limitations.

APPENDIX 4 Calculation of Reduction Factors in Studies to Determine Viral Clearance

The virus reduction factor of an individual purification or inactivation step is defined as the $\log_{10}$ of the ratio of the virus load in the pre-purification material and the virus load in the post-purification material which is ready for use in the next step of the process. If the following abbreviations are used:

Starting material:
vol v'; titer $10^{x'}$;
virus load: (v')($10^{x'}$),

Final material:
vol v''; titer $10^{x''}$;
virus load: (v'')($10^{x''}$),

the individual reduction factors Ri are calculated according to
$10^{Ri} = (v')(10^{x'}) / (v'')(10^{x''})$

This formula takes into account both the titers and volumes of the materials before and after the purification step.

Because of the inherent imprecision of some virus titrations individual reduction factor used for the calculation of an overall reduction factor should be greater than 1.

The overall reduction factor for a complete production process is the sum logarithm of the reduction factors of the individual steps. It represents the logarithm of the ratio of the virus load at the beginning of the first process clearance step and at the end of the last process clearance step. Reduction factors are normally expressed on a logarithmic scale which implies that, while residual virus infectivity will never be reduced to zero, it may be greatly reduced mathematically.

APPENDIX 5 Calculation of estimated Particles per Dose

This is applicable to those viruses for which an estimate of starting numbers can be made, such as endogenous retroviruses.

Example:

I. Assumptions

Measured or estimated concentration of virus in cell culture harvest = 10^6/ml

Calculated viral clearance factor = $>10^{15}$

Volume of culture harvest needed to make a dose of product = 1 litre (10^3 ml)

II. Calculation of Estimated Particles/Dose

$$\frac{(10^6 \text{ virus units/ml}) \times (10^3 \text{ ml/dose})}{\text{Clearance factor} > 10^{15}}$$

$$= \frac{10^9 \text{ particles/dose}}{\text{Clearance factor} > 10^{15}}$$

$$= < 10^{-6} \text{ particles/dose}$$

Therefore, less than one particle per million doses would be expected.

Santé Canada Health Canada

LIGNE DIRECTRICE À L'INTENTION DE L' INDUSTRIE

Évaluation de la sécurité virologique des produits issus de la biotechnologie et dérivés de lignées cellulaires d'origine humaine ou animale

ICH thème Q5A

Publication autorisée par le ministre de la Santé

Date d'approbation par le PPT	1999/12/16
Date mis en vigueur par PPT	2001/01/05

Programme des produits thérapeutiques

Canada

Notre Mission est d'aider les Canadiens et les Canadiennes à maintenir et à améliorer leur état de santé.

Santé Canada

Notre Mission: Faire en sorte que les médicaments, les instruments médicaux et les autres produits thérapeutiques disponibles au Canada soient sûrs, efficaces et de grande qualité et que les stupéfiants et drogues d'usage restreint ne fassent l'objet d'aucun abus et ne soient pas détournés de leurs usages légitimes.

Programme des produits thérapeutiques

LE SITE WEB DU PROGRAMME DES PRODUITS THÉRAPEUTIQUES (Web-PT)

LAISSEZ VOTRE ORDINATEUR FAIRE LES RECHERCHES!

...Vous voulez savoir comment commercialiser un nouveau médicament?

...Vous souhaitez obtenir des renseignements au sujet du processus de réglementation des médicaments?

...Vous voulez connaître quels sont les médicaments les plus récemment autorisés au Canada?

...Vous souhaitez avoir un accès direct à nos formulaires et à nos politiques?

...Vous voulez connaître quelles sont les contraintes en matière d' étiquetage des médicaments?

Vous pouvez obtenir ces renseignements et plusieurs autres en consultant

le site web du programme des produits thérapeutiques
à
www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut

© Ministre, Travaux publics et services gouvernementaux Canada 2000

Disponible au Canada par l'entremise de
Santé Canada - Publications
Edifice Brooke Claxton, L. A. #0913A
Pré Tunney
OTTAWA (Ontario)
K1A 0K9

téléphone : (613) 954-5995
télécopieur : (613) 941-5366

also available in English under the following Title: Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin

N° de catalogue H42-2/67-18-2000F
ISBN 0-662-84883-7

AVANT-PROPOS

La présente ligne directrice a été élaborée par un groupe d'experts de l'ICH et a fait l'objet de consultations, menées par les organismes de réglementation, conformément au processus de l'ICH. Le Comité directeur de l'ICH en a approuvé la version finale et en a recommandé l'adoption par les organismes de réglementation de l'Union européenne, du Japon et des États-Unis.

En adoptant cette ligne directrice de l'ICH, le Programme des produits thérapeutiques (PPT) fait siens les principes et les pratiques qui y sont énoncés. Ce document doit être lu en parallèle avec la lettre d'accompagnement et les sections pertinentes des autres lignes directrices applicables du Programme.

Les lignes directrices sont des documents destinés à guider l'industrie et les professionnels de la santé sur la **façon** de se conformer aux politiques du PPT et aux lois et règlements qui régissent leurs activités. Elles servent également de guide au personnel du PPT lors de l'évaluation et de la vérification de la conformité et permettent ainsi d'appliquer le mandat du Programme d'une façon équitable, uniforme et efficace.

Les lignes directrices sont des outils administratifs n'ayant pas de force de loi, ce qui permet une certaine souplesse d'approche. Les principes et les pratiques énoncés dans le présent document **pourraient être** remplacés par d'autres approches, à condition que celles-ci s'appuient sur une justification scientifique adéquate. Ces autres approches devraient être examinées préalablement en consultation avec le Programme pour s'assurer qu'elles respectent les exigences des lois et des règlements applicables.

Corollairement à ce qui précède, il importe également de mentionner que le Programme se réserve le droit de demander des renseignements ou du matériel supplémentaire, ou de définir des conditions dont il n'est pas explicitement question dans la ligne directrice, et ce, afin d'être en mesure d'évaluer adéquatement l'innocuité, l'efficacité ou la qualité d'un produit thérapeutique donné. Le PPT s'engage à justifier de telles demandes et à documenter clairement ses décisions.

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION 1

II SOURCES POTENTIELLES DE CONTAMINATION VIRALE 2
- A. Virus pouvant être présents dans la banque de cellules primaire (BCP) 3
- B. Virus fortuits pouvant être introduits durant la production 3

III. QUALIFICATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE: ÉPREUVES VIROLOGIQUES 3
- A. Épreuves virologiques suggérées pour la BCP, la banque de cellules de travail (BCT) et pour les cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisées pour la production 3
  - *1. Banque de cellules primaire* 4
  - *2. Banque de cellules de travail* 4
  - *3. Cellules à la limite de l'âge cellulaire in vitro utilisé pour la production* 4
- B. Épreuves recommandées pour la détection et l'identification des virus 5
  - *1. Dépistage des rétrovirus* 5
  - *2. Épreuves in vitro* 5
  - *3. Épreuves in vivo* 6
  - *4. Épreuves de production d'anticorps* 6
- C. Acceptabilité des lignées cellulaires 6

IV. DÉPISTAGE DES VIRUS DANS LE VRAC NON TRAITÉ 6

V. JUSTIFICATION ET PROTOCOLE DES ÉTUDES DE CLAIRANCE VIRALE ET DES ÉPREUVES VIROLOGIQUES SUR LE VRAC PURIFIÉ 7

VI. ÉVALUATION ET CARACTÉRISATION DES MÉTHODES DE CLAIRANCE VIRALE 10
- A. Choix des virus pour l'évaluation et la caractérisation de la clairance virale 11
  - *1. Virus « pertinents » et virus « modèles »* 11
  - *2. Autres considérations* 12
- B. Conception et répercussions des études d'évaluation et de caractérisation de la clairance virale 13
  - *1. Installation et personnel* 13
  - *2. Système de production à échelle réduite* 13

3. Analyse de l'élimination des virus au cours des étapes de la production 13
4. Élimination ou inactivation de virus 14
5. Évaluation de l'inactivation 14
6. Fonction et régénération des colonnes 15
7. Précautions particulières 15

C. Interprétation des études de clairance virale 16
D. Limites des études de clairance virale 18
E. Analyse statistique 19
F. Réévaluation de la clairance virale 19

VII. RÉSUMÉ 20

VIII. GLOSSAIRE 20

Tableau 1 Épreuves virologiques à effectuer une seule fois selon le type de banque de cellules 23

Tableau 2 Exemples d'épreuves virologiques pouvant être utilisées et limites de ces épreuves 24

Tableau 3 Détection de virus dans des épreuves de production d'anticorps 25

Tableau 4 Plan d'action relatif à l'évaluation et à la caractérisation de la clairance virale du procédé et aux épreuves virologiques sur le vrac purifié 26

ANNEXE 1 Produits dérivés de banques de cellules caractérisées et cultivées subséquemment *in vivo* 27

ANNEXE 2 Choix des virus pour les études de clairance virale 28

Tableau A-1 Exemples de virus qui ont été utilisés dans des études de clairance virale 29

ANNEXE 3 Considérations statistiques liées aux épreuves virologiques 30

ANNEXE 4 Calcul des facteurs de réduction dans les études de clairance virale 32

ANNEXE 5 Calcul du nombre de particules par dose 33

I. INTRODUCTION

Le présent document a trait à l'évaluation de la sécurité virologique des produits issus de la biotechnologie dérivés de lignées de cellules caractérisées d'origine humaine ou animale (mammifères, oiseaux, insectes) et indique les données qui doivent être présentées dans la demande de commercialisation ou d'homologation. Aux fins du présent document, le terme « virus » exclut les agents transmissibles non conventionnels comme ceux associés à l'encéphalopathie spongiforme des bovins (ESB) et à la tremblante du mouton. On encourage les répondants à discuter avec les autorités réglementaires de toute question liée à l'ESB.

Le document traite des produits dérivés de cultures de cellules provenant de banques de cellules caractérisées. Il traite des produits dérivés de cultures de cellules *in vitro*, tels les interférons, les anticorps monoclonaux et les produits issus de l' ADN recombinant, comprenant les vaccins à sous-unités recombinants; il traite également des produits dérivés d'hybridomes cultivés *in vivo* en liquide d'ascite. Dans ce dernier cas, certaines considérations spéciales s'appliquent. Il faut donc référer à l'information additionnelle sur les épreuves réalisées sur des cellules multipliées *in vivo* qui figurent dans *l'Annexe 1*. Le présent document ne vise pas les vaccins inactivés, tous les vaccins vivants renfermant des agents qui se répliquent spontanément, ni les vecteurs vivants modifiés génétiquement.

Le risque de contamination virale est une caractéristique commune à tous les produits issus de la biotechnologie dérivés de lignées de cellules. Une telle contamination peut avoir de graves conséquences cliniques; elle peut provenir de la contamination des lignées cellulaires originales (substrats cellulaires) ou de l'introduction fortuite de virus durant la production. Toutefois, jusqu'à maintenant les produits issus de la biotechnologie dérivés de lignées cellulaires n'ont pas été la cause de la transmission de virus. Néanmoins, il reste que la sécurité de ces produits en ce qui a trait à la contamination par des virus ne peut être raisonnablement assurée que par l'instauration d'un programme de dépistage des virus et par l'évaluation de la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver les virus, comme il est décrit plus bas.

Trois approches complémentaires principales sont en usage pour le contrôle d' une contamination virale éventuelle des produits issus de la biotechnologie:

a) choisir et tester les lignées cellulaires et les autres matières premières, y compris les éléments constitutifs du milieu, et vérifier qu'elles sont exemptes de virus indésirables qui peuvent être infectieux et/ou pathogènes pour les humains;

b) évaluer la capacité des procédés de production d'éliminer les virus infectieux;

c) soumettre le produit, aux étapes appropriées de sa production, à des épreuves permettant de confirmer l'absence de virus infectieux.

Toutes les épreuves sont soumises à la limite inhérente à la mesure quantitative des virus, soit la capacité de détecter de faibles concentrations de virus qui dépend, pour des raisons statistiques, de la taille de l'échantillon. Par conséquent, aucune approche ne pourra établir nécessairement à elle seule la sécurité du produit. Dans bien des cas, l'assurance que des virus infectieux sont absents du produit final ne proviendra pas uniquement d'épreuves virologiques directes, mais également de la démonstration que le protocole de purification est capable d'éliminer ou d'inactiver les virus.

Le type et l'étendue des épreuves virologiques et des études de clairance virale requises à différentes étapes de la production dépendront de divers facteurs et devront être établis dans chaque cas et étape par étape. Les facteurs à considérer sont le degré de caractérisation et de qualification de la banque de cellules, la nature des virus décelés, les composantes du milieu de culture, les méthodes de culture, le type d'installation et d'équipement, les résultats des épreuves virologiques après la culture des cellules, la capacité du procédé d'éliminer les virus et enfin le type de produit et son usage clinique prévu.

Le présent document présente un cadre général pour les épreuves virologiques, les expériences nécessaires pour l'évaluation de la clairance virale et une approche recommandée pour la conception des épreuves virologiques et des études de clairance virale. Des renseignements connexes sont présentés dans les annexes et certaines définitions ont été réunies dans un glossaire.

Le fabricant doit adapter les recommandations présentées dans le présent document à son produit et à son procédé de fabrication. L'approche utilisée par le fabricant dans sa stratégie globale de vérification de la sécurité virologique doit être expliquée et justifiée. Il serait utile que le fabricant fournisse, outre les données détaillées, un résumé de son évaluation de la sécurité virologique de qui pourra faciliter la tâche des autorités réglementaires. Ce résumé devrait contenir une brève description de tous les aspects des études de sécurité virologique et des stratégies utilisées pour prévenir la contamination par des virus visés par le présent document.

II SOURCES POTENTIELLES DE CONTAMINATION VIRALE

La contamination par des virus des produits issus de la biotechnologie peut provenir de la source originale des lignées cellulaires ou de l'introduction accidentelle de virus dans le cadre des procédés de production.

A. Virus pouvant être présents dans la banque de cellules primaire (BCP)

Les cellules peuvent présenter une infection virale latente ou persistante (p.ex. virus herpès) ou renfermer un rétrovirus endogène dont le génome persiste dans la cellule et qui peut se transmettre verticalement d'une génération de cellules à l'autre. De tels virus peuvent s'exprimer constitutivement ou devenir inopinément infectieux.

Les virus peuvent être introduits dans les BCP de plusieurs façons : 1) utilisation de lignées cellulaires provenant d'animaux infectés; 2) utilisation de virus pour établir la lignée cellulaire;3) utilisation de réactifs biologiques contaminés, p. ex. constituants sériques animaux; 4) contamination durant la manipulation des cellules.

B. Virus fortuits pouvant être introduits durant la production

Des virus fortuits peuvent être introduits dans le produit final de diverses façons. Mentionnons, entre autres : 1) l'utilisation de réactifs biologiques contaminés, tels des constituants sériques animaux; 2) l'utilisation d'un virus pour provoquer l'expression de gènes codant spécifiquement une protéine d'intérêt; 3) l'utilisation d'un réactif contaminé, tel un anticorps monoclonal sur une colonne d'affinité; 4) l'utilisation d'un excipient contaminé durant la formulation; 5) la contamination durant la manipulation des cellules et des milieux. Une surveillance des paramètres de la culture cellulaire peut être utile pour détecter précocement une contamination virale fortuite.

III. QUALIFICATION DE LA LIGNÉE CELLULAIRE: ÉPREUVES VIROLOGIQUES

Une étape importante dans la qualification d'une lignée cellulaire utilisée dans l'obtention d'un produit issus de la biotechnologie comprend des épreuves virologiques appropriées.

A. Épreuves virologiques suggérées pour la BCP, la banque de cellules de travail (BCT) et pour les cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisées pour la production

Le *tableau 1* donne un exemple d'épreuves virologiques à exécuter une fois seulement à diverses phases de la culture cellulaire, notamment la BCP, la BCT et les cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production.

1. Banque de cellules primaire

Il faut réaliser des épreuves poussées de dépistage de la contamination de la BCP par des virus endogènes et non endogènes. Dans le cas des lignées cellulaires hétérohybrides dans lesquelles un ou plusieurs des partenaires sont d'origine humaine ou d'autres primates, il faut réaliser des épreuves de dépistage des virus humains ou d'autres primates, puisqu'une contamination virale de ces cellules peut présenter un danger particulier.

Les épreuves de dépistage de virus non endogènes doivent comprendre des épreuves d'inoculation *in vitro* et *in vivo* et toutes les autres épreuves spécifiques appropriées, notamment l'épreuve de production d'anticorps de souris ("mouse antibody production" ou "MAP"), basées sur les antécédents de repiquage de la lignée cellulaire, de façon à déceler la présence éventuelle de virus.

2. Banque de cellules de travail

Chaque BCT utilisée comme substrat cellulaire pour la production d'un médicament doit faire l'objet d'un dépistage des virus fortuits, soit par le moyen d'une épreuve de dépistage, soit par l'analyse des cellules parvenues à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* qui proviennent de cette BCT. Lorsque des épreuves appropriées de dépistage des virus non endogènes ont été réalisées sur la BCP et que des cellules cultivées au moins jusqu'à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* ont été obtenues de la BCT et ont fait l'objet d'une épreuve de dépistage de la présence de virus fortuits, il n'est pas nécessaire de répéter ces épreuves sur la BCT initiale. Les épreuves de production d'anticorps ne sont habituellement pas nécessaires dans le cas de la BCT. Une autre approche dans laquelle toutes les épreuves sont réalisées sur la BCT plutôt que sur la BCP serait également acceptable.

3. Cellules à la limite de l'âge cellulaire in vitro utilisé pour la production

La limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production doit être basée sur des données provenant de cellules utilisées pour la production à l'échelle pilote ou industrielle et multipliées au moins jusqu'à l'âge cellulaire *in vitro* proposé. En général, les cellules utilisées pour la production sont obtenues par multiplication de la BCT; la BCP pourrait également être utilisée pour préparer ces cellules. Les cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* doivent faire l'objet d'un dépistage des virus endogènes qui pourraient ne pas avoir été décelés dans la BCT et la BCP. L'exécution des épreuves appropriées (p.ex. *in vitro* et *in vivo*) au moins une fois sur des cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production sert à confirmer que le procédé de production n'est pas sujet à la contamination par des virus fortuits. Lorsque des virus fortuits sont détectés à ce niveau, il faut vérifier minutieusement le procédé pour déterminer la cause de la contamination et le modifier complètement au besoin.

B. Épreuves recommandées pour la détection et l'identification des virus

De nombreuses épreuves peuvent servir à détecter les virus endogènes et fortuits. Le *tableau 2* en donne des exemples. Ces protocoles d'épreuves sont ceux qui sont recommandés à l'heure actuelle, mais la liste n'est ni exhaustive ni définitive. Comme les techniques les plus pertinentes peuvent changer avec les progrès de la science, on pourra proposer des techniques de remplacement, à la condition qu'elles soient étayées par des données adéquates. On incite les fabricants à en discuter avec les autorités réglementaires. D'autres épreuves peuvent se révéler nécessaires selon le cas. Pour que les épreuves soient suffisamment sensibles et spécifiques, il faut prévoir les contrôles appropriés. Des épreuves ou approches spécifiques peuvent s'avérer nécessaires lorsque, d'après l'espèce d'origine du substrat cellulaire, il est fort probable qu'un certain virus soit présent. Lorsque la lignée cellulaire utilisée pour la production est d'origine humaine ou provient d'un autre primate, il faut réaliser des épreuves additionnelles de détection des virus humains, comme les virus responsables de l'immunodéficience et de l'hépatite, à moins de justifications contraires. L'amplification en chaîne par la polymérase ("PCR" ou «polymerase chain reaction») peut se révéler utile pour détecter des séquences de ces virus humains ou celles d'autres virus spécifiques. Voici une brève description de la méthode générale et des considérations théoriques sur lesquelles le fabricant doit fonder son approche.

1. Dépistage des rétrovirus

Dans le cas de la BCP et des cellules cultivées au moins jusqu'à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production, il faut faire un dépistage des rétrovirus, et réaliser notamment des épreuves d'infectivité au moyen de cultures de cellules susceptibles et des études au microscope électronique (ME). Lorsqu'on ne décèle pas d'infectivité et qu'aucun rétrovirus ou particule semblable n'est observé au ME, on doit utiliser la transcriptase inverse (TI) ou d'autres épreuves appropriées pour détecter des rétrovirus qui pourraient se révéler non infectieux. Des études d'induction ne se sont pas révélées utiles.

2. Épreuves in vitro

Dans les épreuves *in vitro*, on inocule le produit d'essai (*voir le tableau 2*) dans diverses cultures cellulaires indicatrices susceptibles capables de déceler toute une gamme de virus humains et animaux pertinents. On choisit les cellules en fonction de l'espèce d'origine de la banque de cellules, mais il faut inclure une lignée cellulaire humaine ou provenant d'un autre primate vulnérable aux virus humains. La nature de l'épreuve et de l'échantillon à analyser dépend du type de virus susceptible d'être présent selon l'origine des cellules ou à cause de leur manipulation. Il faut rechercher les virus cytopathogènes et hémadsorbants.

3. Épreuves in vivo

Le produit d'essai (*voir le tableau 2*) doit être inoculé à des animaux, notamment à des souriceaux non sevrés et à des souris adultes, et dans des oeufs embryonnés pour révéler les virus qui ne se multiplient pas dans les cultures cellulaires. On peut utiliser d'autres espèces animales selon la nature et la source des lignées cellulaires utilisées. Il faut surveiller la santé des animaux et enquêter sur toute anomalie pour établir la cause de la maladie.

4. Épreuves de production d'anticorps

On peut déceler certains virus spécifiques à l'espèce dans des lignées cellulaires de rongeur en inoculant le produit d'essai (*voir le tableau 2*) à des animaux exempts de virus et en déterminant le taux d'anticorps sériques ou l'activité enzymatique après une certaine période. On peut utiliser par exemple l'épreuve de production d'anticorps de souris ("MAP"), l'épreuve de production d'anticorps de rat ("RAP") et l'épreuve de production d'anticorps de hamster ("HAP"). Le *tableau 3* indique les virus qui peuvent être décelés par les épreuves de production d'anticorps.

C. Acceptabilité des lignées cellulaires

On sait que certaines lignées cellulaires utilisées pour la fabrication du produit renfermeront des rétrovirus endogènes, d'autres virus ou des séquences virales. Dans de telles circonstances, le protocole recommandé pour la fabrication est décrit à la section V du présent document. Les autorités réglementaires détermineront dans chaque cas l'acceptabilité des lignées cellulaires renfermant des virus autres que des rétrovirus endogènes, en tenant compte de l'analyse des risques et des avantages, basée sur l'avantage que présente le produit et son usage clinique prévu, la nature des virus présents, leur capacité d'infecter des humains ou de causer des maladies aux humains, le procédé de purification du produit (p. ex. les données d'évaluation de la clairance virale) et le nombre d'épreuves virologiques effectuées sur le vrac purifié.

IV. DÉPISTAGE DES VIRUS DANS LE VRAC NON TRAITÉ

Le vrac non traité est constitué d'une ou de plusieurs récoltes de cellules et de milieux de culture. Lorsque les cellules ne sont pas facilement accessibles (p. ex. réacteur à fibres creuses ou systèmes semblables), le vrac non traité est constitué du liquide recueilli dans le fermenteur. En prélevant un échantillon représentatif du vrac non traité dans le réacteur de production avant tout

traitement ultérieur, on a une forte probabilité de détecter une contamination par des virus fortuits, le cas échéant. Les épreuves appropriées de détection des virus doivent être exécutées à l'étape du vrac non traité, à moins qu'une épreuve soit rendue plus sensible grâce à un traitement partiel initial (p. ex. le vrac non traité peut être toxique pour les cultures de cellules, alors que le vrac partiellement traité peut ne pas l'être).

Dans certains cas, il peut être préférable de réaliser l'épreuve sur un mélange constitué de cellules intactes et de cellules lysées, et d'enlever le surnageant de la culture de cellules du réacteur de production avant tout traitement ultérieur. Des données provenant d'au moins trois lots de vrac non traité à l'échelle pilote ou industrielle doivent être présentées dans le cadre d'une demande de commercialisation ou d'homologation.

On recommande aux fabricants d'élaborer des programmes d'évaluation continue de la présence de virus fortuits dans les lots de production. On doit déterminer l'ampleur, le nombre et la fréquence des épreuves virologiques à effectuer sur le vrac non traité à partir de plusieurs facteurs, dont la nature des lignées cellulaires utilisées pour l'obtention des produits désirés, les résultats et le nombre des épreuves virologiques exécutées durant la qualification des lignées cellulaires, la méthode de culture, les sources de matières premières et les résultats des études de clairance virale. En général des épreuves *in vitro*, utilisant une ou plusieurs lignées cellulaires sont employées pour dépister la présence de virus dans le vrac non traité. On peut utiliser au besoin la méthode "PCR" ou d'autres méthodes appropriées.

En général, le matériel récolté dans lequel des virus fortuits ont été détectés ne doit pas être utilisé dans la fabrication du produit. Lorsque des virus fortuits sont détectés à cette étape, il faut vérifier minutieusement le procédé pour déterminer la cause de la contamination et prendre les mesures appropriées.

V. JUSTIFICATION ET PROTOCOLE DES ÉTUDES DE CLAIRANCE VIRALE ET DES ÉPREUVES VIROLOGIQUES SUR LE VRAC PURIFIÉ

Il est important de concevoir le protocole le plus pertinent et le plus rationnel pour les épreuves virologiques à l'étape de la BCP, aux diverses étapes de la production du médicament et jusqu'au produit final, en passant par une évaluation et une caractérisation de la clairance virale du vrac non traité. L'évaluation et la caractérisation de la clairance virale jouent ici un rôle important. L'objectif devrait être d'obtenir la meilleure assurance que le produit est libre de contamination virale.

Lors du choix des virus à utiliser dans une étude de clairance, il est utile de faire la distinction entre la nécessité d'évaluer la capacité du procédé d'éliminer les virus que l'on sait présents et celle d'établir la robustesse du procédé par la caractérisation de la clairance de virus modèles non spécifiques (voir plus loin). Le glossaire donne une définition des virus pertinents, modèles spécifiques et modèles non spécifiques. Pour évaluer un procédé, il est nécessaire de connaître la quantité de virus qui peut être présent dans ce procédé, p.ex. dans le vrac non traité, et quelle quantité peut être éliminée. Il est également utile de connaître l'influence du temps sur les méthodes d'inactivation afin d'assurer l'efficacité du procédé. Dans l'évaluation de la clairance de contaminants connus, il faut effectuer des études poussées d'inactivation en fonction du temps, faire la démonstration que l'inactivation ou l'élimination peut être reproduite et évaluer les paramètres du procédé. Lorsqu'on caractérise la robustesse de clairance d'un procédé de fabrication à l'aide de virus modèles non spécifiques, il faut porter une attention particulière aux virus dépourvus d'enveloppe dans le protocole de l'étude. L'ampleur des études de caractérisation de la clairance virale pourra dépendre des résultats des épreuves réalisées sur des lignées cellulaires et sur le vrac non traité. Ces études seront effectuées de la manière décrite ci-après (*section VI*).

Le *tableau 4* offre un exemple d'un plan d'action relatif à l'évaluation et à la caractérisation de la clairance virale du procédé ainsi qu'aux épreuves virologiques effectuées sur le vrac purifié, basé sur les résultats des épreuves virologiques sur des cellules ou sur le vrac non traité. On envisage divers cas. Dans tous les cas, il faut effectuer une caractérisation de la clairance à l'aide de virus modèles non spécifiques. Les situations les plus courantes sont les **cas A** et **B**. Les systèmes de production contaminés par un virus autre qu'un rétrovirus de rongeur ne sont normalement pas utilisés. Lorsqu'il existe des motifs probants et justifiés de produire un médicament à l'aide d'une lignée cellulaire dans les **cas C, D** ou **E**, il faut en discuter avec les autorités réglementaires. Dans les **cas C, D** et **E**, il est important de prévoir des étapes efficaces et validées d'inactivation ou d'élimination du virus en question dans le procédé de fabrication.

Cas A : Lorsqu'aucun virus ou particule semblable à un virus ou à un rétrovirus n'a été décelé dans les cellules ou dans le vrac non traité, les études d'élimination et d'inactivation doivent être effectuées à l'aide de virus modèles non spécifiques, ainsi qu'il a déjà été précisé.

Cas B : Lorsqu'on a décelé uniquement un rétrovirus de rongeur (ou une particule semblable à un rétrovirus de rongeur jugée non pathogène, comme les particules de type A et R), il faut effectuer une évaluation du procédé à l'aide d'un virus modèle spécifique, comme le virus de la leucémie murine. Le vrac purifié doit être analysé à l'aide de

méthodes très spécifiques et très sensibles pour la détection du virus en question. En ce qui a trait à l'autorisation de commercialisation, il faut fournir des données provenant d'au moins trois lots de vrac purifié à l'échelle pilote ou industrielle. Des lignées cellulaires comme CHO, C127, BHK et des hybridomes murins ont été fréquemment utilisés comme substrats pour la production de médicaments et aucun problème de sécurité lié à la contamination des produits par des virus n'a été signalé. Dans le cas des lignées cellulaires dans lesquelles les particules endogènes ont été amplement caractérisées et dont la clairance a été démontrée, il n'est habituellement pas nécessaire de vérifier l'absence de particules non infectieuses dans le vrac purifié. Il convient d'effectuer des études avec des virus modèles non spécifiques, comme dans le **cas A**.

Cas C : Lorsque les cellules ou le vrac non traité renferment un virus autre qu'un rétrovirus de rongeur, pour lequel aucune preuve de sa capacité d'infecter les humains n'a été démontrée (comme les virus indiqués dans la *note 2* du *tableau 3*, sauf les rétrovirus de rongeur (**cas B**)), les études d'évaluation de l'élimination et de l'inactivation des virus doivent être effectuées avec le virus identifié. S'il n'est pas possible d'utiliser le virus identifié, il faut utiliser des virus pertinents ou des virus modèles spécifiques pour démontrer que la clairance est acceptable. Il faut déterminer, dans le cadre de l'évaluation du procédé à l'égard de ces virus, l'inactivation du virus identifié en fonction du temps (ou encore du virus pertinent ou du virus modèle spécifique) aux étapes cruciales de l'inactivation. Les méthodes utilisées pour les épreuves virologiques sur le vrac purifié doivent être très spécifiques et très sensibles pour la détection du virus en question. Pour les fins de l'autorisation de commercialisation, il faut fournir des données provenant d'au moins trois lots de vrac purifié fabriqué à l'échelle pilote ou industrielle.

Cas D : Lorsqu'un pathogène connu pour l'humain est identifié, comme ceux indiqués dans la *note 1* du *tableau 3*, le produit ne sera acceptable que dans des circonstances exceptionnelles. Dans un tel cas, il est recommandé d'utiliser le virus identifié pour les études d'évaluation de l'élimination et de l'inactivation des virus et des méthodes très spécifiques et très sensibles pour la détection du virus en question. S'il n'est pas possible d'utiliser le virus identifié, il faut utiliser des virus pertinents ou des virus modèles spécifiques (voir ci-après). Il doit être démontré que le procédé permet l'élimination et l'inactivation des virus utilisés durant les procédés de purification et d'inactivation. Il faut obtenir des données d'inactivation en fonction du temps pour les étapes cruciales de l'inactivation dans le cadre du processus d'évaluation. Les méthodes utilisées pour les épreuves sur le vrac purifié doivent être très spécifiques et très sensibles pour la détection du virus en question. Pour les fins de l'autorisation de commercialisation, il faut fournir des données provenant d'au moins trois lots de vrac purifié fabriqué à l'échelle pilote ou industrielle.

Cas E **:** Lorsqu'un virus qui ne peut être classé par les méthodes actuelles et détecté dans les cellules ou le vrac non traité, le produit est habituellement considéré comme inacceptable car le virus peut se révéler pathogène. Dans le cas très rare où il existe des motifs probants et justifiés de fabriquer un médicament à l'aide d'une telle lignée cellulaire, les autorités réglementaires doivent être consultées avant d'aller plus loin.

VI. ÉVALUATION ET CARACTÉRISATION DES MÉTHODES DE CLAIRANCE VIRALE

L'évaluation et la caractérisation des méthodes d'élimination ou d'inactivation des virus jouent un rôle important dans l'établissement de la sécurité d'emploi des produits issus de la biotechnologie. De nombreux cas de contamination dans le passé ont été liés à des agents dont la présence n'était pas connue ou même soupçonnée et, bien que des produits biologiques dérivés de divers sources autres que des lignées cellulaires bien caractérisées aient été impliqués, une évaluation de la clairance virale permet d'assurer que le procédé peut éliminer des virus inconnus, non soupçonnés et dangereux. Les études doivent être bien documentées et bien contrôlées.

L'objectif des études de clairance virale est d'évaluer les étapes du procédé qui peuvent être considérées comme efficaces dans l'inactivation ou l'élimination des virus et d'évaluer quantitativement le degré de réduction globale des virus que le procédé permet d'obtenir. On peut obtenir cette information en ajoutant délibérément des quantités importantes d'un virus à la matière première et/ou aux différentes fractions obtenues lors des diverses étapes du procédé et en démontrant son élimination ou son inactivation au cours des étapes subséquentes. Il n'est pas nécessaire d'évaluer ou de caractériser chaque étape d'un procédé de fabrication si l'on arrive à démontrer une clairance adéquate avec un plus petit nombre d'étapes. Il ne faut pas oublier que d'autres étapes du procédé peuvent avoir un effet indirect sur le degré d'inactivation ou d'élimination des virus obtenu. Les fabricants doivent expliquer et justifier l'approche utilisée dans les études destinées à évaluer la clairance virale. On peut obtenir une réduction de l'infectivité des virus en éliminant les virions ou en les inactivant. Pour chaque étape de production évaluée, il faut décrire les mécanismes probables de perte de l'infectivité virale en indiquant si elle est due à l'inactivation ou à l'élimination. En ce qui concerne les étapes d'inactivation, il faut planifier l'étude de façon à prélever des échantillons à différents temps, puis à dessiner une courbe d'inactivation (*voir la section VI.B.5*).

Les études d'évaluation de la clairance virale sont réalisées pour démontrer la clairance d'un virus dont la présence est reconnue dans la BCP et/ou pour procurer une certaine assurance que des virus fortuits qui n'ont pu être détectés, ou qui pourraient être introduits dans le procédé de

production, seront éliminés ou inactivés. Les facteurs de réduction sont normalement exprimés sur une échelle logarithmique, ce qui signifie que si l'infectivité résiduelle d'un virus ne sera jamais réduite à zéro, elle pourra quand même être grandement réduite mathématiquement.

Outre les études de clairance virale visant les virus dont la présence est reconnue, il faut réaliser des études pour caractériser la capacité d'éliminer ou d'inactiver d'autres virus. L'objet des études sur des virus dont la présence n'est pas reconnue ou prévue, mais qui peuvent présenter diverses propriétés biochimiques et biophysiques, est de caractériser la robustesse du procédé plutôt que d'obtenir une valeur cible d'inactivation ou d'élimination. Il est souhaitable de démontrer la capacité du procédé de production d'inactiver ou d'éliminer les virus (*voir la section VI.C*). Ces études n'ont pas pour but d'évaluer un risque spécifique lié à la sécurité d'emploi du produit. Il n'est donc pas nécessaire d'obtenir une valeur de clairance spécifique.

A. Choix des virus pour l'évaluation et la caractérisation de la clairance virale

Les virus choisis pour les études d'évaluation et de caractérisation de la clairance virale du procédé, doivent être choisis pour leur ressemblance aux virus qui peuvent contaminer le produit et doivent présenter une large gamme de propriétés physico-chimiques, de manière à vérifier la capacité du système d'éliminer les virus en général. Le fabricant doit justifier le choix des virus conformément aux objectifs de l'étude d'évaluation et de caractérisation et aux indications fournies dans la présente directive.

1. Virus « pertinents » et virus « modèles »

L'un des aspects importants d'une étude de clairance virale est de déterminer quels virus on doit utiliser. Ces virus appartiennent à trois catégories : les virus pertinents, les virus modèles spécifiques et les virus modèles non spécifiques.

Les virus pertinents sont des virus utilisés dans les études de clairance virale qui sont soit les virus identifiés ou des virus appartenant aux mêmes espèces que ceux dont la présence est reconnue ou qui sont susceptibles de contaminer le substrat cellulaire ou tout autre réactif ou matériel utilisé dans le procédé de production. Il faut faire la démonstration que la méthode de purification et/ou d'inactivation peut éliminer ou inactiver ces virus. Lorsqu'aucun virus pertinent n'est disponible ou lorsqu'il n'est pas bien adapté aux études de clairance virale (p. ex. lorsqu'on ne peut pas en obtenir un titre suffisamment élevé *in vitro*), il faut le remplacer par un virus modèle spécifique. Un virus modèle spécifique approprié peut être un virus étroitement apparenté au virus observé ou soupçonné (même genre ou famille) et dont les propriétés physiques et chimiques sont semblables.

Les lignées cellulaires dérivées de rongeurs renferment habituellement des particules de rétrovirus endogènes ou des particules apparentées qui peuvent se révéler infectieuses (particules de type C) ou non infectieuses (particules cytoplasmiques de type A et R). Il importe de déterminer la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver les rétrovirus de rongeurs présents dans les produits obtenus de ces cellules. On peut utiliser pour ce faire un virus de la leucémie murine, qui est un virus modèle spécifique dans le cas des cellules d'origine murine. Lorsque des lignées cellulaires humaines sécrétant des anticorps monoclonaux ont été obtenues par l'immortalisation des lymphocytes B par le virus Epstein-Barr ("EBV"), il faut déterminer la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver un virus herpès . Le virus de la pseudorage peut également être utilisé comme virus modèle spécifique.

Lorsque l'objectif est de caractériser la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver les virus en général, c.-à-d. de caractériser la robustesse de la méthode de clairance, il faut effectuer des études de caractérisation de la clairance virale avec un virus modèle non spécifique aux propriété différentes. Les données obtenues d'études avec des virus pertinents ou des virus modèles spécifiques peuvent également contribuer à cette évaluation. Il n'est pas nécessaire d'utiliser tous les types de virus. La préférence doit aller aux virus qui montrent une résistance importante aux traitements physiques ou chimiques. Les résultats obtenus avec ces virus fournissent des données utiles sur la capacité du procédé de production d'éliminer ou d'inactiver les virus en général. Le choix et le nombre de virus utilisés dépendront de la qualité et de la caractérisation des lignées cellulaires et du procédé de production.

L'annexe 2 et *le tableau A-1* donnent des exemples de virus modèles utiles possédant diverses structures physico-chimiques et des exemples de virus qui ont été utilisés dans des études de clairance virale.

2. *Autres considérations*

Les points suivants sont aussi à considérer:

a) Il est souhaitable d'utiliser des virus qui peuvent être cultivés à des titres élevés, mais ce n'est pas toujours possible.

b) Il faut une épreuve efficace et fiable pour la détection de chaque virus utilisé et pour chaque étape de fabrication vérifiée.

c) Il faut porter attention aux dangers que certains virus peuvent présenter pour la santé du personnel qui exécute les études de clairance.

B. Conception et répercussions des études d'évaluation et de caractérisation de la clairance virale

1. Installation et personnel

Les BPF interdisent l'introduction des virus dans une installation de production. Par conséquent, les études de clairance virale doivent être effectuées dans un laboratoire séparé doté du matériel permettant de faire des travaux virologiques, avec un personnel d'expérience dans ce domaine et aidé du personnel de production chargé de concevoir et de préparer une version à échelle réduite de la méthode de purification.

2. Système de production à échelle réduite

La validité de la réduction de l'échelle de production doit être démontrée. Le degré de purification obtenu avec la version à échelle réduite doit être le plus représentatif possible de celui qu'il est possible d'obtenir avec le procédé de production. Dans le cas de matériel de chromatographie, la hauteur du lit des colonnes, le taux du débit linéaire, le ratio débit/volume du lit de la colonne (temps de contact), les types de tampons et de gels, le pH, la température et la concentration des protéines, des sels et du produit doivent être représentatifs du procédé à l'échelle industrielle. Le profil d'élution obtenu doit être similaire. Les mêmes considérations s'appliquent à d'autres méthodes. On doit discuter des écarts inévitables et de leur influence sur les résultats.

3. Analyse de l'élimination des virus au cours des étapes de la production

Lorsqu'on exécute des études de clairance virale, il est souhaitable d'évaluer la contribution de plus d'une étape de production à l'élimination de virus. Il faut évaluer séparément chaque étape susceptible de contribuer à l'élimination ou à l'inactivation de virus et donner une définition exacte de ce qu'est une étape de production. Il faut une quantité suffisante de virus à chaque étape pour obtenir une évaluation adéquate de l'efficacité de cette étape. En général, il faut ajouter le virus au matériel en cours de procédé à chaque étape évaluée. Dans certains cas, il suffit d'ajouter un titre élevé de virus au vrac non purifié et d'en vérifier la concentration entre les diverses étapes. Lorsque l'élimination de virus résulte de l'utilisation de méthodes de séparation, il est recommandé, le cas échéant et dans la mesure du possible, de déterminer la distribution de la charge virale dans les différentes fractions. Lorsqu'on utilise des tampons virucides dans plusieurs étapes du procédé de fabrication, on peut faire appel à d'autres stratégies, comme l'addition en parallèle de virus dans des tampons moins virucides, dans le cadre de l'évaluation globale du procédé. Il faut déterminer le titre du virus avant et après chaque étape vérifiée. Les épreuves quantitatives de l'infectivité doivent être suffisamment sensibles et reproductibles et elles doivent être exécutées avec un nombre suffisant d'échantillons en parallèle pour assurer la validité statistique du résultat. Lorsque cela

s'avère justifié, on peut avoir recours à des épreuves quantitatives non liées à l'infectivité. Il faut inclure des virus témoins dans toutes les épreuves d'infectivité pour assurer la sensibilité de la méthode. En outre, il faut établir la valeur statistique des prélèvements de virus présents à faible concentration (*Annexe 3*).

4. Élimination ou inactivation de virus

On peut réduire l'infectivité d'un virus en l'éliminant ou en l'inactivant. Pour chaque étape de production évaluée, il faut indiquer si le mécanisme probable de perte de l'infectivité virale tient à une inactivation ou à une élimination du virus. Lorsque le procédé de production ne permet pas d'obtenir une réduction adéquate de l'infectivité et que l'élimination du virus est considérée comme un facteur important de la sécurité d'emploi du produit, il faut introduire des étapes spécifique ou additionnelles d'inactivation ou d'élimination. Il peut être nécessaire de faire la distinction entre l'élimination et l'inactivation à une étape donnée, par exemple lorsqu'il est possible qu'un tampon utilisé dans plus d'une étape contribue à l'inactivation à chaque étape; ainsi, il faut distinguer la contribution à l'inactivation d'un tampon utilisé dans plusieurs étapes de chromatographie et l'élimination obtenue à chacune de ces étapes.

5. Évaluation de l'inactivation

Pour évaluer l'inactivation de virus, il faut ajouter aux matières premières non traitées ou à des matières intermédiaires une quantité connue de virus infectieux et calculer le facteur de réduction obtenu. Il faut comprendre que l'inactivation d'un virus n'est pas une simple réaction du premier ordre et qu'elle est habituellement plus complexe, avec une phase 1 rapide et une phase 2 lente. Il faut donc planifier l'étude de façon à prélever des échantillons à différents temps puis à obtenir une courbe d'inactivation. Il est recommandé que les études d'inactivation comprennent au moins un point de prélèvement dans le temps compris entre le temps zéro et le temps d'exposition minimum, en plus du point correspondant au temps d'exposition minimum. Les données additionnelles sont particulièrement importantes lorsque le virus est un virus pertinent réputé pathogène pour l'humain et qu'on veut établir une méthode d'inactivation efficace. Toutefois, dans le cas des études d'inactivation dans lesquelles des virus modèles non spécifiques sont utilisés ou lorsque des virus modèles spécifiques sont utilisés à la place de virions telles les particules intracytoplasmiques apparentées à un rétrovirus que l'on trouve dans les cellules CHO, il faut montrer que la clairance est reproductible dans au moins deux études indépendantes. Dans la mesure du possible, il faut déterminer la charge virale initiale à partir du virus détecté dans le matériel de départ auquel il a été inoculé. Si cela n'est pas possible, on peut calculer la charge virale initiale à partir du titre de la préparation virale utilisée pour

inoculer le matériel de départ. Lorsque l'inactivation est trop rapide pour tracer une courbe d'inactivation dans les conditions d'usage du procédé, il faut prévoir des témoins appropriés démontrant que l'inactivation est réellement responsable de la réduction de l'infectivité.

6. Fonction et régénération des colonnes

La capacité des colonnes de chromatographie et autres dispositifs utilisés dans le procédé de purification dans le but d'éliminer les virus peut varier avec le temps et après un usage répété. Un calcul de la stabilité de la clairance virale après plusieurs utilisations peut justifier l'utilisation répétée de ces colonnes. Il faut fournir l'assurance que tout virus potentiellement retenu par le système de production est adéquatement détruit ou éliminé avant que le système ne soit réutilisé, par exemple en démontrant que les méthodes de nettoyage et de régénération inactivent ou éliminent vraiment le virus.

7. Précautions particulières

a) Dans la préparation d'un virus dont le titre est élevé, il faut éviter l'agrégation qui pourrait accroître l'élimination du virus, mais réduire son inactivation et fausser ainsi la corrélation avec la production réelle.

b) Afin d'assurer la fiabilité des épreuves de dépistage, il faut porter attention à la quantité minimale de virus pouvant être détectée.

c) L'étude doit prévoir des épreuves témoins en parallèle pour évaluer la perte d'infectivité due à des raisons comme la dilution, la concentration, la filtration ou le stockage des échantillons avant le titrage.

d) Un petit volume de virus doit être ajouté au produit de façon à ne pas diluer ou modifier les caractéristiques du produit. Un échantillon protéique dilué lors des épreuves n'est plus identique au produit obtenu à l'échelle industrielle.

e) De petites différences au niveau des tampons, des milieux ou des réactifs, par exemple, peuvent modifier la clairance virale de façon notable.

f) L'inactivation des virus se fait en fonction du temps. Par conséquent, le temps qu'un produit, auquel on a ajouté un virus, demeure dans une solution tampon ou dans une colonne de chromatographie doit correspondre aux conditions du procédé à l'échelle industrielle.

g) Il faut évaluer séparément la toxicité ou l'interférence que peuvent présenter les tampons et le produit dans les épreuves utilisées pour déterminer le titre du virus, car ces éléments peuvent avoir un effet néfaste sur les cellules indicatrices. Si les solutions sont toxiques pour les cellules indicatrices, il pourra être nécessaire de diluer ou de dialyser le tampon renfermant le virus ajouté ou d'en modifier le pH. Si le produit a lui-même une activité antivirale, il pourra être nécessaire d'exécuter une étude de clairance sans le produit dans un essai à blanc, quoique le fait d'omettre le produit ou de lui substituer une protéine semblable ne possédant pas d'activité antivirale puisse avoir un effet sur le comportement du virus à certaines étapes de la production. Il faut prévoir suffisamment de témoins pour indiquer l'effet des techniques utilisées uniquement pour préparer l'échantillon (p. ex. dialyse, stockage) sur l'élimination ou l'inactivation du virus ajouté.

h) De nombreuses étapes de purification font appel de façon répétitive aux mêmes tampons ou colonnes. Il faut tenir compte des effets de cette approche dans l'analyse des données. L'efficacité d'une méthode d'élimination des virus peut varier selon l'étape de la fabrication à laquelle elle est utilisée.

i) Le facteur de réduction global peut être sous-estimé lorsque les conditions de production ou les tampons sont trop cytotoxiques ou virucides; il faut en discuter dans chaque cas. Le facteur de réduction global peut également être surestimé à cause de limitations inhérentes ou d'une conception inadéquate des études de clairance virale.

C. Interprétation des études de clairance virale

Acceptabilité

Le but d'une évaluation de l'inactivation ou de l'élimination des virus est d'analyser et de caractériser les étapes du procédé qui peuvent être considérées comme efficaces dans l'inactivation ou l'élimination des virus et de déterminer quantitativement le niveau global de réduction des virus que le procédé de fabrication permet d'obtenir. Dans le cas des virus qui contaminent le produit, c'est-à-dire dans les cas B à E, il est important de montrer que les virus sont non seulement éliminés ou inactivés, mais que la méthode de purification a une capacité supérieure de clairance virale pour assurer au produit final un degré suffisant de sécurité d'emploi. La quantité de virus éliminée ou inactivée par le procédé de production doit être comparée à la quantité de virus qui peut être présente dans le vrac non traité.

Pour effectuer cette comparaison, il est important d'évaluer la quantité de virus dans le vrac non traité. Pour ce faire, on doit utiliser des épreuves d'infectivité ou d'autres méthodes comme la microscopie électronique à transmission (MET). Le procédé de purification dans son ensemble doit pouvoir éliminer beaucoup plus de virus que la quantité qu'on estime être présente dans l'équivalent d'une dose unique du vrac non traité. Voir *l'annexe 4* pour le calcul des facteurs de réduction des virus et *l'annexe 5* pour le calcul du nombre de particules par dose.

Les fabricants doivent reconnaître que les mécanismes de clairance peuvent différer d'une catégorie de virus à l'autre. Il faut tenir compte d'un ensemble de facteurs dans l'évaluation des données appuyant l'efficacité des méthodes d'inactivation ou d'élimination des virus soit:

i) la pertinence du virus témoin utilisé;

ii) la conception des études de clairance;

iii) la réduction logarithmique obtenue;

iv) le temps nécessaire à l'inactivation;

v) les effets éventuels d'une variation des paramètres du procédé sur l'inactivation ou l'élimination des virus;

vi) la limite de sensibilité de l'épreuve;

vii) la sélectivité possible des méthodes d'inactivation ou d'élimination à l'égard de certaines catégories de virus.

On peut obtenir une clairance efficace en ayant recours à des étapes d'inactivation multiples, à des étapes de séparation multiples et complémentaires ou à un ensemble d'étapes d'inactivation et de séparation. Comme les méthodes de séparation peuvent dépendre des propriétés physico-chimiques très spécifiques d'un virus qui influencent son interaction avec les matrices de gel et ses propriétés de précipitation, les virus modèles et le virus cible peuvent être séparés de manière différente. Les paramètres de la fabrication influençant la séparation doivent être adéquatement définis et contrôlés. Des différences peuvent provenir de la modification des propriétés de surface, par exemple la

glycosylation. Toutefois, en dépit de ces variables éventuelles, on peut obtenir une élimination efficace grâce à un ensemble d'étapes de séparation complémentaires ou un ensemble d'étapes d'inactivation et de séparation. Par conséquent, des étapes de séparation bien conçues, telles des méthodes de chromatographie, des étapes de filtration et d'extraction, peuvent éliminer efficacement les virus à la condition qu'elles soient exécutées dans des conditions bien contrôlées. Une étape efficace d'élimination des virus devrait donner une réduction reproductible de la charge virale dans au moins deux études indépendantes.

On exprime généralement le facteur de réduction global sous forme de la somme des facteurs individuels. Toutefois, une réduction du titre du virus de l'ordre de 1 $\log_{10}$ ou moins serait considérée négligeable et, à moins d'être justifiée, serait ignorée.

Lorsque le procédé de production ne permet d'obtenir qu'une faible réduction de l'infectivité et que l'élimination des virus est considérée comme un facteur important de la sécurité d'emploi du produit, il faut introduire au moins une autre étape spécifique d'inactivation ou d'élimination. Les fabricants doivent justifier l'acceptabilité des facteurs de réduction obtenus pour tous les virus. Les résultats seront évalués en fonction des facteurs susmentionnés.

D. Limites des études de clairance virale

Les études de clairance virale sont utiles pour confirmer que le produit final présente un degré acceptable de sécurité d'emploi, mais elles n'établissent pas elles-même cette sécurité d'emploi. Toutefois, un certain nombre de facteurs dans la conception et l'exécution des études de clairance virale peuvent mener à une évaluation fausse de la capacité du procédé d'éliminer l'infectivité virale. Ces facteurs comprennent:

1. les préparations de virus utilisées dans les études de clairance virale d'un procédé de production seront probablement obtenues à partir d'une culture de tissu. Au cours d'une étape de production un virus provenant d'une culture de tissu peut se comporter différemment du virus à l'état natif, par exemple, lorsque la pureté ou le degré d'agrégation du virus natif et du virus cultivé diffèrent;

2. l'inactivation d'un virus se produit souvent suivant une courbe biphasique dans laquelle une phase initiale rapide est suivie par une phase plus lente. Il est possible qu'un virus qui a pu survivre à une première étape d'inactivation soit plus résistant

à des étapes ultérieures. Par exemple, si la fraction virale résistante prend la forme d'agrégats, le virus peut résister à toute une gamme de traitements chimiques différents ainsi qu'à la chaleur;

3. la capacité de l'ensemble du procédé d'éliminer l'infectivité est exprimée sous forme de la somme des logarithmes des facteurs de réduction obtenus à chaque étape. La somme des facteurs de réduction obtenus en plusieurs étapes, notamment lorsque les étapes ne donnent qu'une faible réduction (p.ex. inférieure à 1 $\log_{10}$), peut surestimer la capacité véritable d'élimination des virus. De plus, il ne faut pas inclure des valeurs de réduction obtenues par la répétition de méthodes identiques ou presque, à moins qu'on puisse le justifier;

4. l'expression des facteurs de réduction sous forme de réduction logarithmique du titre signifie que l'infectivité résiduelle pourra être grandement réduite, mais qu'elle ne sera jamais réduite à zéro. Par exemple, une réduction de l'infectivité d'une préparation renfermant 8 $\log_{10}$ d'unités infectieuses par mL d'un facteur de 8 $\log_{10}$ laisse une infectivité de zéro $\log_{10}$ par mL ou une unité infectieuse par mL, compte tenu de la limite de détection de l'épreuve;

5. le procédé à l'échelle pilote peut différer du procédé à l'échelle industrielle, malgré le soin apporté à la conception d'un procédé à échelle réduite;

6. l'addition de facteurs de réduction provenant de mécanismes d'inactivation similaires dans le cadre du procédé de fabrication peut surestimer la clairance virale globale.

E. Analyse statistique

Les études de clairance virale doivent être accompagnées d'une analyse statistique des données permettant d'évaluer les résultats. Les résultats des études doivent être valides sur le plan statistique pour appuyer les conclusions émises (*voir l'annexe 3*).

F. Réévaluation de la clairance virale

Lorsque des changements importants sont apportés au procédé de production ou à la méthode de purification, il faut envisager que ces changements aient des effets directs et indirects sur la clairance virale et réévaluer le système au besoin. Par exemple, des

changements apportés au procédé de production peuvent modifier considérablement la quantité de virus produite par la lignée cellulaire; la modification des étapes du procédé peut modifier le degré de clairance virale.

VII. RÉSUMÉ

Le présent document propose des approches pour l'évaluation du risque de contamination virale et pour l'élimination des virus d'un produit qui contribuent à la sécurité d'emploi des produits issus de la biotechnologie dérivés de lignées cellulaires animales ou humaines; le document souligne également la valeur de diverses stratégies :

A. caractérisation ou analyse approfondie du substrat cellulaire de départ afin d'identifier tout virus présent à titre de contaminant;

B. évaluation du risque par une détermination du tropisme humain des contaminants;

C. établissement d'un programme approprié d'épreuves pour la détection de virus fortuits dans le vrac non traité;

D. conception minutieuse d'études de clairance virale à l'aide de différentes méthodes d'inactivation ou d'élimination des virus dans le même procédé de production de manière à obtenir une clairance virale maximale;

E. réalisation d'études évaluant l'inactivation et l'élimination des virus.

VIII. GLOSSAIRE

Âge cellulaire *in vitro*
Temps écoulé depuis la décongélation d'une ou de plusieurs ampoules de la banque de cellules primaire jusqu'à la récolte du produit dans le contenant de production : il peut correspondre à la durée de culture, au nombre de doublements de la population cellulaire ou au nombre de passages suivant une procédure définie pour diluer la culture.

Banque de cellules primaire (BCP)
Portion d'un pool de cellules, lequel a généralement été préparé dans des conditions définies, à partir du clone cellulaire sélectionné; le pool est divisé en plusieurs portions, réparties en autant de contenants qui sont conservés dans des conditions définies. Toutes les banques de cellules de travail sont obtenues à partir de la banque de cellules primaire. Les nouvelles banques de cellules

primaires (issues d'un clone cellulaire, d'une banque de cellules primaire ou d'une banque de cellules de travail obtenus préalablement) doivent subir les analyses prévues pour les banques de cellules primaires, à moins qu'on puisse justifier une autre approche.

Banque de cellules de travail (BCT)
La banque de cellules de travail se prépare avec des portions d'une suspension cellulaire homogène obtenues par culture de la banque de cellules primaire dans des conditions définies.

Caractérisation de la clairance virale du procédé
Études de la clairance virale dans lesquelles des virus modèles non spécifiques sont utilisés pour évaluer la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver des virus.

Cellules de production
Substrat cellulaire utilisé pour fabriquer le produit.

Clairance virale
Élimination du virus cible par l'élimination des virions ou l'inactivation de l'infectivité du virus.

Évaluation de la clairance virale du procédé
Études de la clairance virale dans lesquelles des virus pertinents ou des virus modèles spécifiques sont utilisés pour déterminer la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver ces virus.

Inactivation
Réduction de l'infectivité d'un virus par une modification chimique ou physique.

Substrat cellulaire
Cellules utilisées pour fabriquer le produit.

Temps d'exposition minimal
Période la plus courte pendant laquelle une étape de traitement est maintenue.

Particule apparentée à des virus
Structure visible au microscope électronique morphologiquement apparentée à des virus connus.

Virus
Agent infectieux, potentiellement pathogène, ne possédant qu'un type d'acide nucléique (ARN ou ADN), incapable de croître seul et de se diviser par fission binaire et se multipliant à partir de son matériel génétique dans une cellule hôte.

Virus fortuit
Virus contaminant introduit accidentellement.

Virus endogène
Entité virale dont le génome fait partie de la lignée germinale de l'espèce d'origine de la lignée cellulaire et qui est intégrée de manière covalente au génome de l'animal d'où provient la lignée cellulaire. Aux fins du présent document, les virus non intégrés et introduits intentionnellement, tel l' "EBV" ("Epstein-Barr virus") utilisé pour immortaliser des substrats cellulaires ou le virus de la papillomatose bovine, font partie de cette catégorie.

Virus modèle non spécifique
Virus utilisé pour caractériser la clairance virale du procédé lorsque le but visé est de caractériser la capacité du procédé de fabrication d'éliminer ou d'inactiver les virus en général, c.-à-d. de caractériser la robustesse du procédé de purification.

Virus modèle spécifique
Virus étroitement apparenté au virus connu ou soupçonné (même genre ou famille), dont les propriétés physiques et chimiques sont semblables à celles du virus observé ou soupçonné.

Virus non endogène
Virus présent dans la banque de cellules primaire, mais provenant de sources extérieures.

Virus pertinent
Virus utilisé dans les études de la clairance virale du procédé. Il s'agit soit du virus identifié ou d'un virus de la même espèce que l'on croit capable, ou est susceptible de contaminer le substrat cellulaire ou tout autre réactif ou matière utilisés dans le procédé de production.

Vrac non traité
Une ou plusieurs récoltes réunies de cellules et de milieux de culture. Lorsque les cellules ne sont pas facilement accessibles, le vrac non traité est constitué du liquide recueilli dans le fermenteur.

Tableau 1 Épreuves virologiques à effectuer une seule fois selon le type de banque de cellules

	BCP	*BCT*[a]	*Cellules à la limite*[b]
Épreuves de détection des rétrovirus et d'autres virus endogènes			
Infectivité	+	-	+
Microscopie électronique[c]	+[c]	-	+[c]
Transcriptase inverse[d]	+[d]	-	+[d]
Autres épreuves spécifiques de détection de virus[e]	le cas échéant[e]	-	le cas échéant[e]
Épreuves de détection des virus non endogènes ou fortuits			
Épreuves *in vitro*	+	-[f]	+
Épreuves *in vivo*	+	-[f]	+
Épreuves de production d'anticorps[g]	+[g]	-	-
Autres épreuves spécifiques de détection de virus[h]	+[h]	-	-

a. Voir la section III.A.2.

b. Cellules à la limite : cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* utilisé pour la production (voir la section III.A.3).

c. Peut également déceler d'autres agents.

d. Pas nécessaire si l'épreuve d'infectivité rétrovirale donne un résultat positif.

e. Pour les lignées cellulaires dont on sait qu'elles ont été infectées par ces agents.

f. Pour la première BCT, cette épreuve doit être exécutée sur des cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro* obtenues à partir de cette BCT; pour les autres BCT, on peut n'effectuer qu'une seule épreuve *in vitro* et *in vivo*, soit directement sur la BCT soit sur les cellules à la limite de l'âge cellulaire *in vitro*.

g. P. ex. "MAP, RAP, HAP", — utilisées habituellement dans le cas de lignées cellulaires de rongeur.

h. P. ex. pour les lignées cellulaires d'origine humaine, d'autre primate ou d'autre lignées cellulaires, le cas échéant.

Tableau 2 Exemples d'épreuves virologiques pouvant être utilisées et limites de ces épreuves

ÉPREUVE	*PRODUIT D'ESSAI*	*CAPACITÉ DE DÉTECTION*	*LIMITE DE DÉTECTION*
Production d'anticorps	Lysat de cellules et leur milieu de culture	Antigènes viraux spécifiques	Antigènes non infectieux dans les systèmes d'épreuve animaux
Dépistage des virus *in vivo*	Lysat de cellules et leur milieu de culture	Large gamme de virus pathogènes pour les humains	Agent incapables de se répliquer ou de provoquer la maladie dans le système d'épreuve
Dépistage des virus *in vitro* :		Large gamme de virus pathogènes pour les humains	Agent incapables de se répliquer ou de provoquer la maladie dans le système d'épreuve
1. Caractérisation d'un témoin cellulaire	1. Lysat de cellules et leur milieu de culture (pour la culture, des cellules intactes doivent faire partie du produit d'essai)		
2. Dépistage dans le procédé de production	2. Produit récolté du vrac non traité ou lysat de cellules et leur milieu de culture provenant du réacteur de production		
MET sur :		Virus et particules apparentées à des virus	Épreuve qualitative avec identification
1. Substrat cellulaire 2. Surnageant de culture de tissu	1. Cellules viables 2. Surnageant de culture acellulaire		
Transcriptase inverse (TI)	Surnageant de culture acellulaire	Rétrovirus et expression de la TI virale	Ne détecte que les enzymes dont l'activité est optimale dans des conditions optimales. L'interprétation peut être difficile à cause de la présence d'enzymes cellulaires; bruit de fond avec certains échantillons concentrés
Infectivité par des rétrovirus (RV)	Surnageant de culture acellulaire	Rétrovirus infectieux	RV incapables de se répliquer ou de former des plages isolées dans le système d'épreuve choisi
Coculture	Cellules viables	Rétrovirus infectieux	RV incapables de se répliquer
1. Infectivité			1. Voir infectivité par RV ci-dessus
2. Titre de la MET			2. Voir MET ci-dessus[a]
3. Titre de la TI			3. Voir TI ci-dessus
PCR (amplification en chaîne par la polymérase)	Cellules, liquide de culture et autres matières	Séquences virales spécifiques	Des séquences amorces doivent être présentes. N'indique pas si le virus est infectieux

a En outre, difficulté de distinguer le produit d'essai des cellules indicatrices.

Tableau 3 Détection de virus dans des épreuves de production d'anticorps

«MAP»	*«HAP»*	*«RAP»*
Virus de l'ectromélie[2,3]	Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCM)[1,3]	Virus Hantaan[1,3]
Virus Hantaan[1,3]	Virus de la pneumonie murine (PVM)[2,3]	Virus KRV[2,3]
Virus K[2]	Réovirus de type 3 (Réo3)[1,3]	Virus de l'encéphalomyélite murine (Theilers, GDVII)[2]
Virus à lacticodéshydrogénase (LDM)[1,3]	Virus Sendai[1,3]	Virus de la pneumonie murine (PVM)[2,3]
Virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCM)[1,3]	SV5	Coronavirus du rat (RCV)[2]
Virus MVM[2,3]		Réovirus de type 3 (Réo3)[1,3]
Adénovirus murin (MAV)[2,3]		Virus Sendai[1,3]
Cytomégalovirus murin (MCMV)[2,3]		Virus SDAV[2]
Virus de l'encéphalomyélite murine (Theilers, GDVII)[2]		Virus Toolan (HI)[2,3]
Virus de l'hépatite murine (MHV)[2]		
Rotavirus murin (EDIM)[2,3]		
Virus PVM[2,3]		
Virus du polyome [2]		
Réovirus de type 3 (Réo3)[1,3]		
Virus Sendai[1,3]		
Virus thymique[2]		

1. Virus pour lesquels on possède des données indiquant qu'ils peuvent infecter les humains ou d'autres primates.

2. Virus pour lesquels on ne possède pas de données indiquant qu'ils peuvent infecter les humains.

3. Virus capable de se répliquer *in vitro* dans des cellules provenant d'humains ou d'autres primates.

Tableau 4 Plan d'action relatif à l'évaluation et à la caractérisation de la clairance virale du procédé et aux épreuves virologiques sur le vrac purifié

	Cas A	*Cas B*	*Cas C*[2]	*Cas D*[2]	*Cas E*[2]
STATUT					
Présence de virus[1]	-	-	+	+	(+)[3]
Particules apparentés à des virus[1]	-	-	-	-	(+)[3]
Particules apparentés à des rétrovirus[1]	-	+	-	-	(+)[3]
Virus identifiés	sans objet	+	+	+	-
Virus pathogènes pour les humains	sans objet	-4	-4	+	inconnus
ACTION					
Caractérisation de la clairance virale du procédé à l'aide de virus modèles non spécifiques	oui[5]	oui[5]	oui[5]	oui[5]	oui[7]
Évaluation de la clairance virale du procédé à l'aide de virus pertinents ou de virus modèles spécifiques	non	oui[6]	oui[6]	oui[6]	oui[7]
Épreuve virologique sur le vrac purifié	sans objet	oui[8]	oui[8]	oui[8]	oui[8]

1. Résultats des épreuves virologiques sur le substrat cellulaire et/ou au niveau du vrac non traité. Les cultures cellulaires utilisées pour la production qui sont contaminées par des virus seront en général inacceptables. Les virus endogènes (tels les rétrovirus) ou les virus qui font partie intégrante de la BCP pourront être acceptables si des méthodes adéquates d'évaluation de la clairance virale sont appliquées.

2. L'utilisation de matières premières contaminées par des virus, que ces virus soient réputés infectieux et/ou pathogènes ou non, ne sera admise que dans des cas exceptionnels.

3. Virus observés par des méthodes directes ou indirectes.

4. Jugés non pathogènes.

5. Il faut effectuer une caractérisation de la clairance virale du procédé à l'aide de virus modèles non spécifiques.

6. Il faut effectuer une évaluation de la clairance virale du procédé à l'aide de virus pertinents ou de virus modèles spécifiques.

7. Voir le texte sous le cas E.

8. Il faut confirmer l'absence de virus détectable dans le cas du vrac purifié à l'aide de méthodes très spécifiques et très sensibles pour la détection du virus en question. Aux fins de l'autorisation de commercialisation, il faut fournir des données provenant d'au moins 3 lots de vrac purifié obtenu à l'échelle pilote ou industrielle. Toutefois, dans le cas de lignées cellulaires comme les cellules CHO dont les particules endogènes ont été amplement caractérisées et pour lesquelles une clairance adéquate a été démontrée, il n'est habituellement pas nécessaire de vérifier la présence de particules non infectieuses dans le vrac purifié.

ANNEXE 1 Produits dérivés de banques de cellules caractérisées et cultivées subséquemment *in vivo*

Dans le cas des produits fabriqués à partir de liquides récoltés d'animaux inoculés avec des cellules provenant de banques caractérisées, il faut fournir des renseignements additionnels concernant les animaux.

Dans la mesure du possible, les animaux utilisés dans la fabrication de produits biotechnologiques ou biologiques doivent être obtenus de colonies bien définies exemptes d'organismes pathogènes spécifiques. Il faut effectuer les épreuves virologiques appropriées, telles celles indiquées au *tableau 3*. Les procédures de quarantaine utilisées pour les animaux nouvellement arrivés et pour les animaux malades doivent être décrites et l'assurance donnée que toutes les méthodes pour circonscrire, nettoyer, et décontaminer, utilisées dans le laboratoire sont suffisantes pour empêcher la propagation d'agents fortuits. Pour ce faire, on peut recourir à un programme sentinelle. Il faut également inclure une liste des agents qui font l'objet d'épreuves de dépistage. Les services vétérinaires doivent être disponibles sur place ou faciles à obtenir. Il faut indiquer dans quelle mesure le vivarium est isolé d'autres secteurs de l'établissement de production. Le personnel de soutien doit être formé adéquatement afin d'assurer la sécurité d'emploi du produit.

Le système de soutien pour les animaux doit être complètement décrit. Ceux-ci comprennent le régime alimentaire, les horaires de nettoyage et d'alimentation, les dispositions relatives à des soins vétérinaires périodiques au besoin et les détails quant à la gestion des animaux après l'inoculation.

Le premier matériel récolté des animaux peut être considéré comme l'équivalent du vrac non traité provenant d'un bioréacteur. Par conséquent, toutes les considérations ayant trait aux épreuves indiquées à la section IV du présent document s'appliquent. En outre, le fabricant doit déterminer le degré de contamination du vrac non traité, déterminer si le matériel est exempt de mycoplasmes et exécuter des épreuves spécifiques à l'espèce ainsi que des épreuves *in vivo* chez des souris adultes et des souriceaux non sevrés.

ANNEXE 2 Choix des virus pour les études de clairance virale

A. Exemples de virus « modèles » utiles

1. Virus modèles non spécifiques présentant une gamme de structures physico-chimiques :

- SV40 (*Polyomavirus maccacae* 1), virus de la poliomyélite humaine 1 (Sabin), parvovirus humain ou d'autres petits virus dépourvus d'enveloppe;
- un virus parainfluenza ou un virus influenza, le virus Sindbis ou d'autres virus à ARN, de taille moyenne à grande, à enveloppe;
- un virus herpès (p. ex. HSV-1 ou un virus de la pseudorage), ou d'autres virus à ADN de taille moyenne à grande.

Ces virus ne constituent que des exemples; leur utilisation n'est pas obligatoire.

2. Dans le cas des substrats cellulaires de rongeurs, on utilise couramment des rétrovirus murins comme virus modèles spécifiques.

B. Exemples de virus qui ont été utilisés dans des études de clairance virale

Le *tableau A-1* énumère plusieurs virus qui ont été utilisés dans des études de clairance virale. Toutefois, il ne s'agit que d'exemples; il n'est pas obligatoire d'utiliser les virus figurant dans ce tableau, et on invite les fabricants a envisager d'autres virus, notamment ceux qui pourraient être plus appropriés pour leur propre procédé de fabrication. En général, il faut évaluer la capacité du procédé d'éliminer au moins trois virus différents possédant des caractéristiques différentes.

Tableau A-1 Exemples de virus qui ont été utilisés dans des études de clairance virale

Virus	Famille	Genre	Hôte naturel	Génome	Envel.	Taille (nm)	Forme	Résistance*
Virus de la stomatite vésiculeuse	Rhabdo	Vésiculovirus	Chevaux Bovins	ARN	oui	70x150	Oblongue	Faible
Virus parainfluenza	Paramyxo	Paramyxovirus	Divers	ARN	oui	100-200+	polym./sphér.	Faible
MuLV	Rétro	Oncovirus de type C	Souris	ARN	oui	80-110	Sphérique	Faible
Virus Sindbis	Toga	Alphavirus	Humains	ARN	oui	60-70	Sphérique	Faible
BVDV	Flavi	Pestivirus	Bovins	ARN	oui	50-70	Polym./sphér.	Faible
Virus de la pseudorage	Herpès		Porcs	ADN	oui	120-200	Sphérique	Moyenne
Poliovirus Sabin type 1	Picorna	Entérovirus	Humains	ARN	non	25-30	Icosaédrique	Moyenne
Virus de l'encéphalo-myocardite (EMC)	Picorna	Cardiovirus	Souris	ARN	non	25-30	Icosaédrique	Moyenne
Réovirus	Réo	Orthoréovirus	Divers	ARN	non	60-80	Sphérique	Moyenne
SV40	Papova	Polyomavirus	Singes	ADN	non	40-50	Icosaédrique	Très élevée
Parvovirus (canin, porcin)	Parvo	Parvovirus	Chiens Porcs	ADN	non	18-24	Icosaédrique	Très élevée

* Résistance à des traitements physico-chimiques basée sur des études de procédé de production. La résistance est relative à un traitement particulier, et elle est utilisée dans le contexte de la connaissance de la biologie du virus et de la nature du procédé de fabrication. Les résultats réels varieront en fonction du traitement.

Ces virus ne sont donnés qu'en exemple; leur utilisation n'est pas obligatoire.

ANNEXE 3 Considérations statistiques liées aux épreuves virologiques

Le titrage des virus présente des problèmes de variation communs à toutes les épreuves biologiques. Il faut effectuer une évaluation de la précision des titrages de virus et des facteurs de réduction qui en sont dérivés et déterminer la validité des épreuves de manière à définir la fiabilité de l'étude. L'objectif de l'évaluation statistique est d'établir que l'étude a été effectuée à un niveau acceptable de compétence virologique.

1. Les méthodes peuvent être binaires ou quantitatives. Les méthodes binaires comprennent les épreuves d'infectivité chez des animaux ou la détermination de la dose infectieuse en culture tissulaire (DICT), dans lesquelles on indique si les animaux ou les cultures sont infectés ou non. On établit alors le degré d'infectivité en fonction de la proportion des animaux ou des cultures infectés. Dans les méthodes quantitatives, l'infectivité mesurée varie continuellement avec la quantité de virus. Les méthodes quantitatives comprennent les épreuves de comptage des plages où chaque plage correspond à une unité infectieuse. Les épreuves binaires et quantitatives peuvent toutes deux faire l'objet d'une évaluation statistique.

2. Les variations d'une épreuve peuvent provenir d'erreurs de dilution, d'effets et de différences statistiques qui peuvent être inconnus ou difficiles à contrôler. Ces effets sont susceptibles d'être plus importants lorsqu'on compare les résultats de différentes séries d'une épreuve (variation entre plusieurs répétions d'une même épreuve) que lorsqu'on compare les résultats d'une seule épreuve (variation à l'intérieur d'une épreuve).

3. L'intervalle de confiance à 95 % pour les résultats de la variation à l'intérieur d'une épreuve devrait être de l'ordre de $\pm 0{,}5$ $\log_{10}$ de la moyenne. On peut déterminer la variation à l'intérieure d'une épreuve par des méthodes statistiques courantes. On peut mesurer la variation entre plusieurs répétitions d'une même épreuve en incluant une préparation de référence, dont l'estimation de l'activité, pour être acceptable, devrait être précise à environ $\pm 0{,}5$ $\log_{10}$ de la moyenne établie dans le laboratoire. Les épreuves moins précises peuvent être acceptables à la condition d'être justifiées.

4. L'intervalle de confiance à 95 % pour le facteur de réduction observé devrait être calculé dans la mesure du possible dans des études de clairance de virus pertinents et de virus modèles spécifiques. Si l'intervalle de confiance à 95 % pour les épreuves virologiques sur le matériel de départ est de +s et que celle pour les épreuves virologiques du matériel après l'étape est de +a, l'intervalle de confiance à 95 % pour le facteur de réduction est égale à :
$\pm\sqrt{S^2+a^2}$.

Probabilité de détection des virus présents à de faibles concentrations

À de faibles concentrations de virus (p. ex dans la fourchette de 10 à 1 000 particules infectieuses par litre), il est évident qu'un échantillon de quelques millilitres peut ou non renfermer des particules infectieuses. La probabilité, *p*, que cet échantillon ne renferme pas de virus infectieux est de :

$P = ((V-v)/V)^n$

où V (litres) est le volume total de la matière à tester, v (litres) est le volume de l'échantillon et n est le nombre absolu de particules infectieuses distribuées statistiquement dans V.

Lorsque V>>v, l'équation répond à la distribution de Poisson :

$p = e^{-cv}$

où c est la concentration des particules infectieuses par litre.

ou, $c = \ln p / -v$.

À titre d'exemple, lorsque l'épreuve porte sur un volume d'échantillon de 1 mL, la probabilité *p* à des concentrations de virus comprises entre 10 et 1 000 particules infectieuses par litre est :

c	10	100	1000
p	0,99	0,90	0,37

Cela indique que pour une concentration de 1 000 virus par litre, un volume de 1 mL ne renfermera pas de virion dans 37 % de l'échantillonnage.

Lorsqu'une partie seulement d'un échantillon est soumise à une épreuve virologique et que l'épreuve donne un résultat négatif, il faut calculer la quantité de virus qui devrait être présente dans l'échantillon total pour donner un résultat positif et tenir compte de cette valeur dans le calcul d'un facteur de réduction. Des intervalles de confiance à 95 % sont souhaitables. Toutefois, dans certains cas, cela peut s'avérer peu pratique à cause des facteurs limitatifs propres à la matière.

ANNEXE 4 Calcul des facteurs de réduction dans les études de clairance virale

On définit le facteur de réduction des virus d'une étape de purification ou d'inactivation comme le $\log_{10}$ du rapport de la charge virale d'une matière avant la purification à la charge virale de la matière après la purification, alors que cette matière est prête à être utilisée dans l'étape suivante du procédé. En utilisant les abréviations suivantes :

Matériel de départ :
vol v'; titre $10^{a'}$;
charge virale : $(v')(10^{a'})$,

Matériel final :
vol v"; titre $10^{a"}$;
charge virale : $(v")(10^{a"})$,

Les facteurs de réduction individuels Ri sont calculés à partir de l'équation suivante :
$10^{Ri} = (v')(10^{a'}) / (v")(10^{a"})$

Cette formule tient compte à la fois du titre et du volume de la matière avant et après l'étape de purification.

Étant donné l'imprécision inhérente à certaines épreuves de titrage de virus, les facteurs de réduction individuels utilisés pour le calcul d'un facteur de réduction global doivent être supérieurs à 1.

Le facteur de réduction global d'un procédé de production complet est la somme du logarithme des facteurs de réduction des étapes individuelles. Il représente le logarithme du rapport de la charge virale au début de la première étape de clairance du procédé à la charge virale à la fin de la dernière étape de clairance du procédé. Les facteurs de réduction sont normalement exprimés sur une échelle logarithmique, ce qui signifie que l'infectivité ne sera jamais réduite à zéro, mais qu'elle pourra être grandement réduite mathématiquement.

ANNEXE 5 Calcul du nombre de particules par dose

Ce calcul s'applique aux virus pour lesquels on peut faire une évaluation du nombre au départ, tels les rétrovirus endogènes.

Exemple :

I. Hypothèses

Concentration mesurée ou estimée de virus dans le matériel de récolte de culture de cellules = 10^6/mL

Facteur de clairance virale calculé = $>10^{15}$

Volume de la récolte de culture nécessaire pour obtenir une dose de produit = 1 litre (10^3 mL)

II. Évaluation du nombre de particules/dose

$$\frac{(10^6 \text{ unités virales/mL}) \times (10^3 \text{ mL/dose})}{\text{facteur de clairance} > 10^{15}}$$

$$= \frac{10^9 \text{ particules/dose}}{\text{facteur de clairance} > 10^{15}}$$

$$= < 10^{-6} \text{ particules/dose}$$

Par conséquent, on peut s'attendre à moins d'une particule par million de doses.